

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS TOLERANTES E FATORES QUE
AFETAM A TRANSFORMAÇÃO DE METILMERCÚRIO POR
*Pseudomonas putida V1 in vitro***

**Lucélia Cabral
(TESE)**

Porto Alegre (RS) Brasil
Março de 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS TOLERANTES E FATORES QUE AFETAM A
TRANSFORMAÇÃO DE METILMERCÚRIO POR *Pseudomonas putida* V1 *in*
*vitro***

LUCÉLIA CABRAL
Engenheira Agrônoma (UDESC)
M.Sc Solos e Nutrição de Plantas (UFLA)

Tese apresentada como
um dos requisitos para a obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Março de 2012

LUCÉLIA CABRAL
Engenheira Agrônoma - UDESC
Mestre em Ciência do Solo - UFPA

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

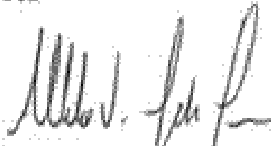
DOUTORA EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 27.03.2012
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 29.08.2012
Por


FLÁVIO A. DE O. CAMARGO
Orientador - PPG Ciência do Solo


ALBERTO V. FENDA JUNIOR
Coordenador do
Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo


ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ
PPG Ciência do Solo/UFRGS


CLÁUDIO ROBERTO FOMSECA SOUSA SOARES
UFSC


FÁTIMA MENEZES BENTO
Departamento de Microbiologia,
Imunologia e Parasitologia/UFRGS


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade
de Agronomia

Dedico,

Carinhosamente aos meus pais e as minhas irmãs Lucia e Luciana.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico– CNPq, pela concessão da bolsa de estudo no exterior.

Ao professor Dr. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo pela oportunidade e orientação.

Ao professor Dr. Clésio Gianello e à equipe do Laboratório de Análises de Solo da UFRGS, especialmente à laboratorista Taís pela ajuda nas determinações analíticas de mercúrio.

À professora Dra. Tamar Barkay pela oportunidade, orientação e amizade durante o estágio do doutorado sanduíche. Aos seus orientados, pela excelente recepção, amizade e atenção durante toda a minha estada nos Estados Unidos.

Ao meu pai Laurides e minha mãe Pedra pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

A minhas irmãs Lucia e Luciana pela amizade, incentivo e apoio sempre. Ao meu cunhado Wagner pela ajuda e pelo apoio.

Aos meus sobrinhos pelo carinho e afeto mesmo em meus inúmeros momentos de ausência.

Ao Anderson, por todo carinho, apoio e paciência, à D. Zélia pela acolhida.

À Patrícia Giovanella, obrigada por toda ajuda nas determinações analíticas de mercúrio, pela atenção e amizade.

Aos amigos do condomínio Villa Trastevere, em especial à Graciele Sarante e Lídia Ivasa, obrigada pela ajuda, amizade e pelo excelente convívio.

À todos os meus colegas do PPG Ciência do Solo e PPG Microbiologia Agrícola e do Ambiente pelo convívio e principalmente pela

amizade. Em especial, agradeço à Cátia Passos, Vanessa Sacramento Cerqueira, Daniel Meyer, Gleidson Rieff e Analu Mantovani.

Aos bolsistas de iniciação científica: Marcelo, Janaína e Alexis, obrigada pela ajuda e dedicação.

A professora Liane, agradeço pelos seus ensinamentos e pela amizade.

A Clara, agradeço pelo excelente de convívio durante minha estada nos Estados Unidos.

Agradeço ainda, a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS TOLERANTES E FATORES QUE AFETAM A TRANSFORMAÇÃO DE METILMERCÚRIO POR *Pseudomonas putida* V1 *in vitro*

Autor: Lucélia Cabral

Orientador: Prof. Flávio A. O. Camargo

As atividades industrial e urbana podem levar à contaminação do ambiente com mercúrio e este causa inúmeros problemas relacionados à saúde do homem e de animais. Os ambientes contaminados com mercúrio e suas formas selecionam micro-organismos tolerantes a esse metal e desta forma podem ser utilizados como estratégia de remediação destes ambientes. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias resistentes ao metilmercúrio em amostras de solos e lodo de esgoto, e determinar a capacidade de remoção de metilmercúrio pelo isolado mais resistente a este composto sob diferentes condições de temperatura, pH, presença de sais, metais pesados, NaCl, e outros compostos de mercúrio como timerosal, acetato de fenilmercúrio e cloreto de mercúrio. Também foram estudados as transformações enzimáticas do metilmercúrio e a presença dos genes *merA* e *merB*. Foram isoladas dezesseis bactérias a partir das amostras coletadas, sendo que *Pseudomonas putida* V1 foi a bactéria mais resistente ao metilmercúrio (CIM = 11,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, volatilizando aproximadamente 90% do metilmercúrio adicionado ao meio de cultura e foi tolerante ao cobre, chumbo, níquel, cromo, cobalto, manganês e bário (100 à 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Este isolado removeu até 77% de metilmercúrio do caldo Luria Bertani (LB) em valores de pH entre 4,0-6,0 e temperatura entre 21-25°C. Observou-se um declínio significativo da capacidade de remoção de metilmercúrio do caldo LB na presença dos sais e metais pesados (57 e 79%, respectivamente), quando comparado aos controles (85 e 89 %, respectivamente). Os testes enzimáticos indicaram ausência da enzima organomercurio liase de *P. putida* V1, enquanto que as reações de polimerase em cadeia (PCR) indicaram que esta bactéria possui o gene *merA*, mas não o *merB*. Nos testes com marcadores radioativos foi observada uma incomum produção de $^{14}\text{CO}_2$. Os resultados sugerem que *P. putida* V1 tem potencial para remoção do metilmercúrio de ambientes contaminados. Estudos adicionais devem ser realizados para se determinar o mecanismo de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1.

^{1/}Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (126 f.) Março, 2012.

ISOLATION OF TOLERANT BACTERIA AND FACTORS THAT AFFECT *in vitro* TRANSFORMATION OF METHYLMERCURY by *Pseudomonas putida* V1

AUTHOR: Lucélia Cabral
ADVISER: Prof. Flávio A. O. Camargo

ABSTRACT

The industrial and urban activities can result in environmental contamination by mercury, which can cause several health problems to human beings and animals. The sites contaminated with mercury and its different forms select mercury-tolerant microorganisms that may potentially be used in a strategy for remediation of these environments. Thus, the aim of this work was to isolate and characterize methylmercury-resistant bacteria from soil and sewage sludge samples, to determine the methylmercury removal ability of the most resistant isolate under different conditions of temperature, pH, presence of salts, heavy metals, NaCl, and other mercury compounds such as thimerosal, phenylmercury acetate and mercury chloride. In addition, the methylmercury enzymatic transformations and the presence of *merA* and *merB* genes were studied. A total of sixteen bacteria were isolated from soil and sewage sludge samples, with *Pseudomonas putida* V1, the most methylmercury-resistant isolate (MIC = 11.5 µM), volatilizing approximately 90% of methylmercury added to culture medium and tolerating copper, lead, nickel, chromium, cobalt, manganese and barium (100 to 1000 µM). This bacterial isolate removed up to 77% of methylmercury from Luria Bertani broth (LB) in pH and temperature values between 4.0-6.0 and 21-25°C, respectively. A significant reduction in the ability to remove methylmercury from LB in the presence of salts and heavy metals (57 and 79%, respectively) in comparison to controls (85 and 89 %, respectively) was observed. The enzymatic assays indicated the absence of organomercurial lyase in *P. putida* V1, whereas the polymerase chain reactions (PCR) indicated that this bacterium possesses *merA* gen, but not *merB* gen. The tests with radioactive markers indicated an uncommon release of ¹⁴CO₂. The results of the present work suggest that *P. putida* V1 has the potential to remove methylmercury from contaminated sites. More studies should be carried out to determine the mechanism of removal of methylmercury by *P. putida* V1.

^{1/} Doctorate Thesis in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Brazil (126 f.) March, 2012

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL	01
2. CAPÍTULO I – Revisão Bibliográfica	04
2.1 Dinâmica do mercúrio no ambiente.....	05
2.2 Contaminação antropogênica com mercúrio.....	08
2.3 Aspectos toxicológicos do mercúrio.....	10
2.4 Remediação de ambientes contaminados com mercúrio.....	12
2.5 Biorremediação de ambientes contaminados com mercúrio.....	14
2.6 Considerações finais.....	17
2.7 Referências Bibliográficas.....	18
3. CAPÍTULO II - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO METILMERCÚRIO E REMOÇÃO DESTE COMPOSTO POR <i>Pseudomonas putida</i> V1	
3.1 Introdução.....	28
3.2 Material e métodos.....	30
3.3 Resultados e discussão.....	35
3.4 Conclusões.....	49
3.5 Referências bibliográficas.....	50
4. CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES DE ESTRESSE NA REMOÇÃO <i>in vitro</i> DE METILMERCÚRIO POR <i>Pseudomonas putida</i> V1	
4.1 Introdução.....	59
4.2 Material e métodos.....	61
4.3 Resultados e discussão.....	65
4.4 Conclusões.....	77
4.5 Referências bibliográficas.....	78
5. CAPÍTULO IV - TRANSFORMAÇÃO DE METILMERCÚRIO POR <i>Pseudomonas putida</i> V1 A PARTIR DE COMPOSTOS MERCURIAIS, DETECÇÃO DA ENZIMA ORGANOMERCURIO LIASE E DOS GENES <i>merA</i> E <i>merB</i>	
5.1 Introdução.....	86
5.2 Material e métodos.....	90
5.3 Resultados e discussão.....	101
5.4 Conclusões.....	115
5.5 Referências bibliográficas.....	116
6. Considerações Finais	121
7. Anexos	123
8. Resumo Biográfico	126

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
CAPITULO I	
Tabela 1.1. Valores orientadores para o solo e água subterrânea no estado de São Paulo para Inorgânicos.....	13
CAPITULO II	
Tabela 2.1. Características químicas dos solos e lodo de esgoto estudados.....	31
Tabela 2.2. Identificação das cepas bacterianas de diferentes locais contaminados baseadas no gene 16S rRNA e a concentração mínima inibitória (CIM) de metilmercúrio.....	38
Tabela 2.3. Concentração inibitória mínima (CIM) de metais para <i>P. putida</i> V1.....	41
Tabela 2.4. pH final, densidade óptica e capacidade de remoção do metilmercúrio do meio de cultivo (%) por <i>P. putida</i> V1 após 24 horas de incubação à 29°C em diferentes pH. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....	46
CAPÍTULO IV	
Tabela 4.1. Primers utilizados em outros estudos de resistência a metilmercúrio para detectar o gene <i>merB</i> de <i>Pseudomonas</i> sp.....	96
Tabela 4.2. Identificação da cepa bacteriana <i>P. putida</i> V1 baseado no sequenciamento do gene <i>merA</i>	111
Tabela 4.3. Novos primers desenhados para esse trabalho a partir das sequências de amostras ambientais para o <i>merB</i> presentes no genbank.....	111

RELAÇÃO DE FIGURAS

CAPITULO I		Página
Figura 1.1.	Transformações do ciclo biogeoquímico do mercúrio (adaptado de Barkay et al., 2003).....	6
Figura 1.2.	Mecanismo de resistência ao mercúrio coordenado pelos genes <i>mer</i> (adaptado de Barkay et al., 2003).....	16
CAPITULO II		
Figura 2.1.	Árvore filogenética das 16 bactérias isoladas de locais contaminados com mercúrio. A árvore neighbor-joining foi construída utilizando-se as sequências do gene 16S rRNA obtidas pelo seqüenciamento dos produtos de PCR e sequências referências de bactérias de solo obtidas no Genbank.....	36
Figura 2.2.	Capacidade de remoção de metilmercúrio do meio de cultivo (%) (barras verticais) e densidade óptica (linha) por cepas bacterianas tolerantes à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29°C na presença de 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....	42
Figura 2.3.	Perfil do crescimento em densidade óptica $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ (linha) e Log (UFC/mL) (barras verticais) e capacidade de remoção de metilmercúrio do meio de cultivo (%) (números acima das barras verticais) por <i>P. putida</i> V1 em diferentes concentrações de metilmercúrio: 0, 2,5, 11,5, 12 ($\mu\text{mol L}^{-1}$) após 24 horas de incubação à 29°C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....	44
CAPÍTULO III		
Figura 3.1.	Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) e densidade óptica em diferentes concentrações de (A) Molibdato (MoO_4^{2-}), (B) Fosfato (PO_4^{3-}), (C) Nitrato (NO_3^-), (D) Sulfato (SO_4^{2-}) por <i>P. putida</i> V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).....	66
Figura 3.2.	Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) e densidade óptica em mistura dos compostos MoO_4^{2-} ; PO_4^{3-} ; NO_3^- ; K_2SO_4 , nas concentrações 1 (1200 mmol L^{-1}), $\frac{1}{2}$ (600	

	mmol L ⁻¹) e 1/3 (400 mmol L ⁻¹) da concentração máxima (300 mmol L ⁻¹) por <i>P. putida</i> V1 tolerante à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0.05).....	68
Figura 3.3.	Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) em diferentes concentrações de NaCl (%) por <i>P. putida</i> V1 tolerante à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0.05).....	70
Figura 3.4.	Crescimento celular de <i>P. putida</i> V1 em meio de cultura com e sem metilmercúrio contendo diferentes concentrações de (A) cobre, (B) Níquel, (C) Cromo, (D) Chumbo (0, 100, 300 e 600 µmol L ⁻¹) após 48 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média.....	72
Figura 3.5.	Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) em baixa e alta concentração de cobre, níquel, cromo e chumbo (µmol L ⁻¹) por <i>P. putida</i> V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t (p < 0.05). Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p < 0.05).....	75

CAPÍTULO IV

Figura 4.1.	Árvore filogenética do gene <i>merB</i> . Árvore neighbor-joining construída foi construída utilizando-se 80 sequências do gene <i>merB</i> de amostras ambientais referenciadas no Genbank.....	97
Figura 4.2.	Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) (●) e crescimento celular na presença (●) e ausência (○) de metilmercúrio por <i>P. putida</i> V1 em caldo LB em 2,3 µmol L ⁻¹ de metilmercúrio. Cada ponto representa a média das triplicatas e as barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t (p < 0.05).....	102
Figura 4.3.	Capacidade de remoção de mercúrio (%) e o crescimento celular em diferentes concentrações de timerosal por <i>P. putida</i> V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey (p <	

	0.05).....	104
Figura 4.4.	Capacidade de remoção de mercúrio (%) e o crescimento celular em diferentes concentrações de acetato fenilmercúrio por <i>P. putida</i> V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).....	105
Figura 4.5.	Capacidade de remoção de mercúrio (%) e o crescimento celular em diferentes concentrações de cloreto de mercúrio por <i>P. putida</i> V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).....	106
Figura 4.6.	Determinação da presença de mercúrio volátil (ppb) por <i>P. putida</i> V1 resistente à metilmercúrio após 4 e 8 horas de incubação à 29 °C (▤) cultura e (▧) controle. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t ($p < 0.05$). Mercúrio remanescente (■) no meio de cultivo (ppb) em caldo LB inoculado com <i>P. putida</i> após 4 e 8 horas de incubação à 29 °C. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t ($p < 0.05$).....	108
Figura 4.7.	Determinação da presença de $^{14}\text{CH}_4$ (▧) e $^{14}\text{CO}_2$ (■) liberado por <i>P. putida</i> V1 resistente à metilmercúrio pela adição de $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$ em caldo LB após 4 e 8 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).....	113

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os metais co-existem com os organismos desde o princípio da vida no planeta e esta relação está associada ao papel específico que muitos destes metais exercem no metabolismo celular, principalmente como cofatores enzimáticos. Entretanto, para alguns dos metais não são conhecidas funções biológicas definidas e geralmente podem ser extremamente tóxicos. A contaminação e a exposição a esses metais tem conduzido a problemas na saúde humana como defeitos genéticos, câncer, lesões na pele, retardamento mental e físico, disfunções motoras, dificuldade de aprendizagem, danos ao sistema nervoso, fígado e rim, bem como abortos e outros sintomas e doenças. Especificamente o cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) e metalóides como o arsênio (As) são extremamente tóxicos e alguns como o Hg não apresentam nenhuma função fisiológica específica.

O Hg se destaca entre estes metais com grande potencial de causar danos ao organismo, especificamente ao sistema nervoso, com alterações no cérebro, na personalidade, arritmias e perda de tato e de memória entre outros sintomas, bem como disfunção motora e todos os problemas decorrentes desta condição. O mercúrio pode ser encontrado no ambiente como mercúrio elementar (Hg^0), mercúrio inorgânico (Hg^{2+}), metilmercúrio (CH_3Hg) ou dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). Destaca-se neste quadro, a possibilidade de metilação do mercúrio no ambiente pela atividade microbiana, podendo causar maiores danos aos organismos presentes neste meio, com grande potencial de atingir a cadeia trófica e contaminar humanos e outros animais. A metilação de mercúrio pode ocorrer tanto na água como

em sedimentos e a atividade microbiana desempenha um papel crítico na modulação da toxicidade do mercúrio nesses ambientes.

A emissão edáfica do Hg para a atmosfera ocorre principalmente pela atividade vulcânica ou pelo intemperismo de rochas ígneas ao passo que antropogenicamente, o mercúrio tem sido produzido pela atividade industrial, onde se destaca a extração de petróleo e do carvão mineral. Como caso específico na indústria petroquímica, o Rio Grande do Sul, destaca-se a contaminação de mercúrio e de outros metais como o cromo (Cr), cádmio (Cd), entre outros pelo refino de petróleo cru argentino, importado da Patagônia, altamente contaminado com estes metais. Por cerca de quatro anos as torres e lagoas de estabilização da refinaria Alberto Pasqualini foram contaminadas com adições crescentes de Hg em concentrações superiores a 1400 g kg^{-1} . O lodo proveniente do tratamento de efluentes, altamente contaminado com mercúrio, foi adicionado ao solo do *landfarming* do Sistema Integrado de Tratamento de Efluentes Líquidos (SITEL) e depositado nos borreiros. Em ambos os locais, as concentrações de mercúrio e de outros metais pesados ultrapassaram em média 5 a 6 vezes a concentração permitida pelo controle ambiental da Fundação Estadual de Proteção Ambiental Henrique Luiz Roessler /RS (FEPAM), que neste caso demanda a remoção da contaminação.

A utilização do potencial microbiano para a detoxificação de contaminantes ambientais no processo chamado biorremediação no Brasil ainda é incipiente, dada à abordagem simplificada desta nova disciplina. A maioria dos estudos referidos como de bioremediação referem-se apenas a avaliação superficial da capacidade biodegradadora de comunidades microbianas não específicas. Para o caso de metais, que não são passíveis de degradação química ou biológica, a capacidade transformadora dos microorganismos pode ser utilizada como estratégia de detoxificação. O desenvolvimento de comunidades microbianas em ambiente contaminado com Hg tem levado ao desenvolvimento de mecanismos de resistência/tolerância a este elemento. No caso do mercúrio, quando este se encontra na forma metilada (CH_3Hg), a enzima organomercurio liase, ativada

pelo gene *merB*, degrada este composto até Hg^{+2} . Na sequência, a enzima mercúrio redutase, regulada pelo gene *merA*, transforma o Hg^{+2} a Hg^0 , removendo-o da pedosfera e diluindo-o na atmosfera.

Os mecanismos de resistência/tolerância ao mercúrio pelos micro-organismos têm sido descritos abundantemente na literatura. Entretanto, a exploração real desta estratégia para a remoção ou transformação do mercúrio no ambiente tem sido praticamente inexistente. Associado a isso, verifica-se um grande potencial de contaminação deste elemento decorrente da atividade industrial e de outras atividades e os problemas ambientais e de saúde pública decorrentes desta contaminação. Deste modo, é possível que o uso de micro-organismos e de seus mecanismos seja uma estratégia eficiente, de baixo custo e de resultados favoráveis à descontaminação do mercúrio do ambiente. Com base nesta hipótese, este trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar bactérias resistentes/tolerantes a metilmercúrio, identificar os genes do operon *mer* e avaliar a volatilização de mercúrio pela atividade microbiana.

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

USO DE MICRO-ORGANISMOS PARA BIORREMEDIAÇÃO DE METILMERCÚRIO

2. CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dinâmica do mercúrio no ambiente

A presença de metais pesados como o mercúrio nos ecossistemas pode interferir no metabolismo das plantas e da biota do solo e seu impacto tem sido bastante discutido mundialmente, pela possibilidade da contaminação da cadeia trófica animal e humana (Nogueira, 1996). O mercúrio faz parte da classe dos metais de transição e possui massa atômica igual a 200,5u e apresenta-se líquido à temperatura ambiente. Esse metal está presente na crosta terrestre na forma elementar, em concentrações que variam entre 21 à 56 ppb (Wedepohl, 1995). No ambiente, o mercúrio ocorre naturalmente nas rochas ígneas, sendo provável que grandes quantidades deste metal sejam liberadas para a atmosfera durante as atividades vulcânicas (Von Burg e Greenwood, 1999).

O mercúrio pode ser encontrado nos depósitos de minérios de cinabar, metacinabar ou outros minerais (% Hg), tais como: tetraedrita ($\text{Cu}_{12}\text{Sb}_4\text{S}_{13}$) – 17,6-21%; minérios de cobre cinzas (Cu, As, Sb) – 14%; spalerite (ZnS) – 1%; wurtzite (ZnS) – 0,03%; stibnite (SbS) – 0,02%; marcassita – 0,07%; ouro bruto (Au) – 60%; prata (Ag) -30%; barita (BaSO_4) – 0,5%; cerussita (PbCO_3) – 0,1%, fluorita (CaF_2) – 0,01%; calcita (CaCO_3) – 0,03%; aragonita (CaCO_3) – 3,7%; siderita (FeCO_3) – 0,01%; pirolusita (MnO_2) – 2%; óxidos hidratados de ferro ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) – 0,2%; grafite

(carbono) – 0,01’%; carvão – 2% (Nascimento & Chassin, 2001). Também pode ser encontrado em associação com outros elementos, como o enxofre, com quem forma o cinabre, metacinabre e hipercinabre (Barnes e Seward, 1997). O mercúrio pode ser encontrado também em outras rochas como as contendo calcário, arenito, serpentina, andesita, basalto e riolita (*alkaline feldspar* e quartzo). Apesar de existir naturalmente no ambiente, o mercúrio pode ser liberado de várias formas, conforme no diagrama do seu ciclo biogeoquímico (Figura 1.1) (Barkay et al., 2003; Bisinoti e Jardim, 2004).

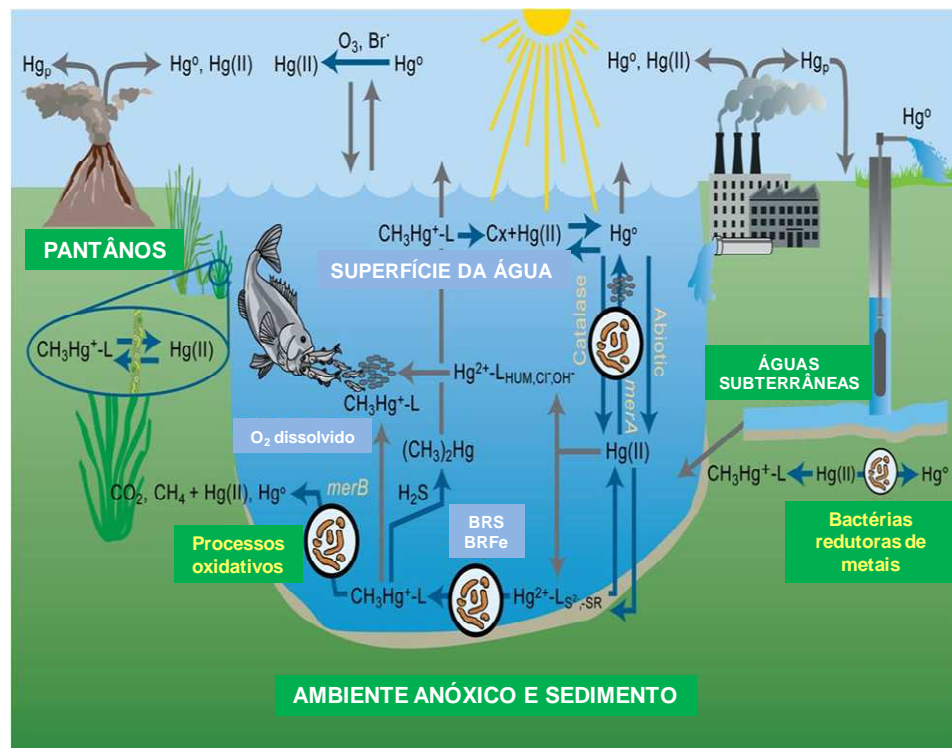


Figura 1.1. Transformações do ciclo biogeoquímico do mercúrio (adaptado de Barkay et al., 2003).

Entre as principais transformações observadas no ciclo do mercúrio, destaca-se a metilação, a desmetilação, a redução e a oxidação, que ocorrem por meio de processos bióticos e abióticos. No processo biótico a metilação ocorre pela transferência do CH_3^- mediada por metiltransferase a partir da metilcobalamina, via acetil-CoA em bactérias sulfato redutoras (Choi, et al., 1994). No processo abiótico a metilação ocorre a partir da interação com ácidos fúlvico e húmico, ácidos carboxílicos e compostos metilados (Weber,

1993; Falter, 1999). Em relação a desmetilação no processo biótico, ocorre a do tipo redutora via o gene *merAB*, produzindo CH₄ e Hg(0), e a oxidativa via processos microbianos, produzindo CO₂ e formas de Hg não identificadas (Begley, et al. 1986a; Begley, et al. 1986b; Oremland, et al. 1991). A demetilação abiótica ocorre pela fotodegradação a 200-400 nm (Suda, et al. 1993; Sellers, et al. 1996), ao passo que o biótico ocorre pela redução do Hg(II) na presença e ausência de luz (Nriagu, 1994; Baltisberger, et al. 1979). O redução biótica do Hg(II) também ocorre pela ação da mercúrio redutase em bactérias e nas algas, especificamente durante o crescimento fototrófico (Ogunseitan, 1998; Devars, et al. 2000). O Hg(0) é oxidado bioticamente pela ação de hidroperoxidases em micro-organismos, plantas e animais (Magos e Clarkson, 1978; Smith, et al. 1998). A oxidação abiótica do Hg(0) ocorre pela ação de vários oxidantes e radicais livres, na ausência de luz, em condições salinas e possivelmente por oxigênio (Amyot, et al. 1997; Lindberg, et al. 2002).

Em ecossistemas aquáticos o mercúrio pode reagir com sulfato formando um precipitado insolúvel. Neste caso, uma pequena quantidade pode ser metilada por bactérias, ocorrendo a troca das espécies inorgânicas de mercúrio [Hg (II)] por formas metiladas [(CH₃Hg)]⁺, tanto na água como no sedimento (Figura1) (Micanori et al, 2000; Barkay et al., 2003; Gochfeld, 2003). Primeiramente, pressupunha-se que apenas micro-organismos anaeróbicos tinham capacidade de metilação do mercúrio (Jensen & Jernelöv, 1969). Entretanto, as bactérias redutoras de sulfato (BRS) têm sido descritas recentemente como responsáveis por metilar mercúrio em sedimentos (Compeau & Bartha, 1985; Gilmour et al., 1992; King et al., 2000). Dessa forma, a atividade microbiana desempenha um papel importante na modulação da toxicidade do mercúrio no ambiente pela metilação do mercúrio (Barkay et al., 2003; Barkay & Wagner-Döbler, 2005).

A metilação de mercúrio pelo processo abiótico pode ser indiretamente relacionada com a atividade biológica devido à dependência dos processos em relação aos produtos biológicos, tais como matéria orgânica dissolvida (Weber, 1993; Siciliano et al., 2005; Barkay & Poulain,

2007). Esse aspecto é preocupante pois muitas indústrias descartam efluentes com elevadas concentrações de matéria orgânica ou carbono orgânico tanto no solo como na água, favorecendo as condições para a metilação. Uma vez formado, o metilmercúrio $[(\text{CH}_3\text{Hg})]^+$ é facilmente biomagnificado na cadeia alimentar, por meio da difusão rápida e da forte ligação com os grupos sulfidrilas de proteínas encontradas nos peixes e nos seres humanos (Micanori et al, 2000; Gochfeld, 2003).

2.2 Contaminação antropogênica com mercúrio

Estima-se que aproximadamente 75% da contaminação global de Hg no ambiente se deva a atividades antropogênicas (Mason e Fitzgerald, 1996). Em países em desenvolvimento como a China, a quantidade de mercúrio aumentou significativamente durante as últimas duas décadas, podendo aumentar a emissão mundial de mercúrio (Jiang et al., 2006). No Brasil, estima-se que as emissões desse metal nos esgotos, efluentes e atividades antropogênicas entre os anos 1800 e 1994, foram em torno de 327 a 448 toneladas, sendo que estes resíduos são usualmente depositados em bacias hidrográficas ou diretamente em rios e lagos (Nascimento e Chassin, 2001). A deposição de resíduos industriais contendo Hg podem também contaminar o solo e nestes ambientes podem ser metilados na forma elementar e na inorgânica (Nascimento e Chassin, 2001; Gochfeld, 2003).

Devido as suas características físicas e químicas tais como: alta densidade, baixa resistência elétrica e volume constante de expansão, o mercúrio tem sido amplamente utilizado em diversos processos industriais (Pacyna et al., 2005). Entre estes processos destacam-se a produção eletrolítica de cloro-soda e acetaldeído, produção de álcalis, baterias, lâmpadas fluorescentes, termômetros, interruptores eletrônicos e amalgamação em extração de ouro (Jiang et al., 2006; Barkay et al., 2003; Micanori et al, 2000). Até recentemente, os sais orgânicos de mercúrio tais como metilmercúrio, etilmercúrio, timerosal, foram utilizados para a produção de pesticidas, biocidas, produtos farmacêuticos e cosméticos. O timerosal

(etilmercúrio) foi utilizado como preservante de algumas vacinas e outros produtos médicos. Muitos países tem restringido ou abolido o uso do mercúrio em formulações devido os problemas de saúde decorrentes do uso deste metal (Pacyna et al., 2005).

A extração de combustíveis fósseis e carvão também gera um aporte de mercúrio ao ambiente. Estas deposições variam em termos de concentração de mercúrio em função do tipo de material e de sua origem (Nascimento e Chassin, 2001). Alguns estudos constataram que as concentrações de mercúrio variaram entre 10 a 8.530 ppb no carvão, podendo chegar até 300.000 ppb de Hg (Nascimento e Chassin, 2001). No petróleo bruto, encontraram-se concentrações de mercúrio entre 20 a 2.000 ppb de Hg e no petróleo não refinado de locais onde os teores de mercúrio são naturalmente mais elevados, encontraram-se concentrações variando de 1.900 a 21.000 ppb de Hg (Nascimento e Chassin, 2001). Em algumas refinarias de petróleo podem ocorrer contaminações específicas com mercúrio, onde as torres de refino e os efluentes podem conter altas concentrações desse poluente. Isso se deve à exploração de um poço de petróleo que seja naturalmente contaminado com Hg. Esta situação ocorreu na Refinaria Alberto Paqualini, Canoas (RS), que durante algum tempo recebeu petróleo da patagônia com altas concentrações de mercúrio.

O carvão mineral é outra fonte potencial de contaminação de mercúrio e no país são produzidos 6,0 milhões de toneladas (IEA, 2007). Estima-se que no Brasil a concentração média de mercúrio em carvão é aproximadamente de 0.05-0.8 mg kg⁻¹, e no carvão extraído no Rio Grande do Sul, da mina de Candiota, a concentração média de mercúrio é aproximadamente de 0.1 mg kg⁻¹ (Pires e Querol, 2004). No carvão extraído nos Estados Unidos há em torno de 0.01-8.0 mg kg⁻¹ de Hg e em amostras do Canadá a concentração média de mercúrio está em torno de 0.02-0.44 mg kg⁻¹ de Hg (Pires e Querol, 2004). Contudo, além do Hg, outros metais pesados podem ser encontrados em carvão, contribuindo dessa forma para que a atividade de mineração seja potencialmente danosa para o ambiente e para o homem (Pires e Querol, 2004; Klein et al., 2009).

Os resíduos e efluentes gerados pela atividade urbana também são outra fonte potencial de contaminação com mercúrio. Foi observado cerca 0.31 mg kg^{-1} de Hg em lodo de esgoto tratado e não tratado da Estação de tratamento de efluentes de Riberão Preto (Oliveira et al., 2011), limitando o uso prolongado destes lodos em solo destinado a agricultura. O mercúrio e outros metais presentes nos lodos constitui uma das principais limitações de uso, pois as concentrações são geralmente superiores as encontradas naturalmente no solo (Pires, 2006). O descarte indiscriminado desses resíduos no solo pode ser prejudicial as plantas e a biota do solo, podendo ocorrer também seu transporte pela água de percolação ou de escoamento e contaminar o subsolo e as águas subterrâneas e superficiais utilizadas para o consumo (Mattiazzo e Andrade, 2000; Moreira e Siqueira, 2006).

2.3 Aspectos toxicológicos do mercúrio

Ao mercúrio tem sido atribuído uma série de sintomas e de problemas relacionados à saúde humana e à qualidade do ambiente. Incluindo os casos de “enlouquecimento” dos trabalhadores das fábricas americanas de chapéus (mad hatter) e o acidente da Baía de Minamata, aonde este elemento ocasionou inúmeros problemas ao sistema nervoso e até mortes. Nesta baía, a Chisso Corp. descartou metilmercúrio no efluente de sua planta de produção de cloreto de vinila, contaminando a biota marinha e águas (Gilbertson e Carpenter 2004; Clarkson e Magos, 2006). A ingestão de peixes e de frutos do mar pela população levou a contaminação por mercúrio e atingiu níveis epidêmicos a partir de 1956 (Micanori, 2000). No Brasil foi observado em locais de mineração em Rondônia que as concentrações de mercúrio nas águas de rios das florestas variavam de $0,1$ a $8,6 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que no sedimento, atingiram até $19\,800 \mu\text{g L}^{-1}$ (Pfeiffer et al., 1989). Quando foram avaliadas as concentrações de mercúrio nas partes comestíveis de peixes, essas atingiram até $2.700 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco, cinco vezes o recomendado pela legislação brasileira para o consumo humano. Representando assim um risco para a população local que utiliza esses produtos na sua dieta alimentar.

O mercúrio é extremamente tóxico para mamíferos e seres humanos, a contaminação por esse metal está associada a problemas de saúde, cujos sintomas e problemas variam em função do tipo de exposição. Em humanos, os efeitos mais importantes relacionados a exposição à compostos inorgânicos de mercúrio ocorrem nos rins e no sistema nervoso (Clarkson et al., 2002). A ação tóxica no sistema nervoso central manifesta-se por meio de tremores, depressão, insônia, dificuldade para concentração, diminuição da memória e fobias (Clarkson et al., 2002).

Dentre as formas de mercúrio, o metilmercúrio é o que inspira maior preocupação, por ser altamente tóxico e facilmente acumulado nos organismos vivos. O metilmercúrio é biomagnificado na cadeia trófica a concentrações muito maiores que as encontradas nas águas superficiais (Wiener et al. 2003; Driscoll et al. 2007; Scheuhammer et al. 2007; Chasar et al. 2009; Rolfhus et al. 2011). O consumo de peixes é a primeira via de exposição humana e da vida selvagem por metilmercúrio (Cole et al. 2004; Imm et al. 2005; Clarkson e Magos 2006; Mergler et al. 2007). Peixes, aves que se alimentam de peixes e mamíferos exibem alterações neuroquímicas, reprodutivas e de comportamento, quando os ambientes em que se encontram, apresentam níveis relevantes de metilmercúrio (Burgess e Meyer 2008; Evers et al. 2008; Scheuhammer et al. 2007; Sandheinrich and Wiener 2011; Scheuhammer et al. 2011). O consumo de peixes com elevados teores de metilmercúrio pode causar efeitos deletérios à saúde humana que vão desde distúrbios neurológicos e comportamentais em crianças até aumento do risco de doenças cardíacas em adultos (Mergler et al., 2007).

Além de ser um potente agente neurotóxico e poder causar paralisia cerebral (Clarkson, 1997; National Research Council, 2000; Clarkson, 2002), a exposição humana a altas doses de metilmercúrio pode causar também surdez, cegueira e deficiência sensorial e motora em adultos (EPA, 2001). Embora o potencial neurotóxico do metilmercúrio seja considerado o principal problema para a saúde, baixas concentrações dessa substância também podem ocasionar problemas cardiovasculares e imunológicos (EPA, 2001). A exposição de gestantes ao metilmercúrio pode

prejudicar o funcionamento do cérebro e afetar o desenvolvimento neurológico do feto (Swain et al., 2007). Além disso, esses sais são muito corrosivos para o trato gastro intestinal, olhos, pele e mucosa, mas os efeitos sobre os rins e os neurotóxicos são considerados como os mais importantes (WHO, 1990, UNEP, 2002).

2.4 Remediação de ambientes contaminados com mercúrio

De modo geral, o solo é o destino final para uma grande variedade de produtos gerados pelo desenvolvimento industrial e tecnológico. A remediação deste ambiente é um conjunto de práticas de correção, que objetivam atenuar ou reparar impactos causados por agentes contaminantes, para garantir sua funcionalidade, bem como evitar a expansão da contaminação. As técnicas de remediação (processos físicos, químicos e biológicos) podem ser indicadas, na tentativa de se reduzir a concentração de contaminantes. As técnicas envolvidas em processos de remediação podem ser classificadas *in situ* e *ex situ*. São exemplos de técnicas *in situ* a volatilização, a biodegradação, a lixiviação, o isolamento/contenção, extração de ar do solo, bioventilação, *air/bio-sparging*, *bio slurping* (Accioly e Siqueira, 2000). Já as técnicas *ex situ* caracterizam-se pela escavação e retirada do solo, este é tratado no local (*on-site*) ou fora dele (*off-site*), são exemplos dessas técnicas: tratamento térmico, solidificação, extração e tratamento de água subsuperficial, extração química e escavação são exemplos de técnicas *ex situ* (Accioly e Siqueira, 2000; Seabra, 2008).

A definição da estratégia de remediação mais apropriada para determinada área é um processo complexo e específico a cada situação, devendo ser considerados vários fatores (Vangronsveld & Ruttens, 1999). Apesar do elevado número de técnicas existentes, estas são geralmente muito específicas, começando pelo nível da contaminação e natureza do contaminante (orgânico versus inorgânico). Geralmente, a concentração no ambiente de um contaminante é o primeiro dado para se estabelecer um processo de remediação e em alguns casos, como da CETESB, são definidos

valores orientadores para a intervenção e remediação de áreas contaminadas (Tabela 1.1) (Barbosa et al., 2008).

Tabela 1.1. Valores orientadores para o solo e água subterrânea no estado de São Paulo para Inorgânicos. CETESB (2006).

Substância	Solo (mg.kg ⁻¹ de peso seco) ⁽¹⁾					Água
	Referência de qualidade	Prevenção	Intervenção			Subterrânea (µg.L ⁻¹)
			Agrícola APMax	Residencial	Industrial	Intervenção
Inorgânicos						
Alumínio	-	-	-	-	-	200
Antimônio	<0,5	2	5	10	25	5
Arsênio	3,5	15	35	55	150	10
Bário	75	150	300	500	750	700
Boro	-	-	-	-	-	-
Cádmio	<0,5	1,3	3	8	20	5
Chumbo	17	72	180	300	900	10
Cobalto	13	25	35	65	90	5
Cobre	35	60	200	400	600	2.000
Cromo	40	75	150	300	400	50
Ferro	-	-	-	-	-	300
Manganês	-	-	-	-	-	400
Mercurio	0,05	0,5	12	36	70	1
Molibdênio	<4	30	50	100	120	70
Níquel	13	30	70	100	130	20
Nitrato (como N)	-	-	-	-	-	10.000
Prata	0,25	2	25	50	100	50
Selênio	0,25	5	-	-	-	10
Vanádio	275	-	-	-	-	-
Zinco	60	300	450	1000	2000	5.000

Em relação aos métodos convencionais de remoção de poluentes ambientais, a biorremediação apresenta a vantagem de ser altamente específica, propiciar a remediação *in situ* e mostra grande potencial de melhoria de eficiência com uso de engenharia genética (Camargo et al., 2007). Em alguns casos como no descarte de lodos e resíduos oriundos da indústria petroquímica, geralmente são utilizadas as técnicas do “*landfarming*”

e *landspreading*". Estas são algumas das tecnologias de bioremediação que consistem na aplicação do resíduo na superfície do solo, de modo a reduzir as concentrações dos constituintes de petróleo por meio da biodegradação microbiana (Paula et al., 2006). Estas tecnologias geralmente envolvem o revolvimento dos solos contaminados para estimular a atividade microbiana aeróbica dentro dos solos por meio de aeração e ou a adição de minerais, nutrientes e umidade e tem se mostrando bastante promissoras (Jacques et al., 2007; Seabra et al., 2008).

2.5 Biorremediação de ambientes contaminados com mercúrio

Os micro-organismos que habitam os solos naturais ou modificados pela ação antropogênica (agricultura, deposição de resíduos, etc.) são importantes para a manutenção e funcionamento destes solos, bem como para a remoção de agentes tóxicos. Os micro-organismos possuem uma longa convivência com os metais, sendo isto comprovado pela grande quantidade de metais divalentes e de transição presente no centro ativo de uma série de enzimas (Lovley & Coates, 1997; Camargo et al., 2007). Quando em excesso, os micro-organismos desenvolveram mecanismos que permitem a sua sobrevivência na presença destes metais (Silver & Phung, 2005).

Os principais mecanismos de resistência e tolerância a metais são os seguintes: biossorção, precipitação, precipitação, biomineralização, reações/transformações, proteínas ligantes, sideróforos, biossurfactantes (Nies; 1999; Camargo et al., 2007). Esses mecanismos são conferidos por plasmídeos ou transposons, podendo ser elementos facultativos ou acessórios, sem que isso afete sua viabilidade. Entretanto, sua presença pode conferir às células hospedeiras características fenotípicas adicionais, que podem ser vantajosas sob determinadas condições ambientais, como por exemplo, a capacidade de sobreviver em ambientes contaminados (Vermelho et al. 2009).

A biorremediação baseia-se no uso de organismos (macro ou micro) e de sua atividade metabólica para remoção de poluentes do ambiente. Nesse processo podem ser utilizados organismos nativos ou introduzidos e para degradar e detoxificar o contaminante como no caso do hidrocarbonetos, que são convertidos em CO_2 e H_2O ou como no caso do mercúrio e metilmercúrio, que são convertidos a vapor de mercúrio. A biorremediação pode ser utilizada para tratar as contaminações de hidrocarbonetos, solventes orgânicos halogenados, compostos orgânicos halogenados, não clorados pesticidas e herbicidas, compostos nitrogenados, metais (chumbo, mercúrio, cromo), radionuclídeos (EPA, 2005).

Em relação ao mercúrio, os micro-organismos que apresentam resistência a este elemento podem sobreviver no ambiente por meio de efluxo, quelação por polímeros enzimáticos, precipitação, biometilação e redução enzimática (Nies, 1999; Silver e Phung, 2005). A redução enzimática relaciona-se ao mecanismo de resistência *mer*. Esse mecanismo de transformação do mercúrio é específico e diferente do mecanismo de transformação de outros metais pesados. Como pode ser observado na Figura 1.2, o mecanismo *mer* desempenha um papel muito importante na ciclagem do mercúrio no ambiente (Osborn et al., 1997). O gene regulador do mecanismo de resistência ao mercúrio é o *merR* (Figura 1.2). Este gene foi primeiramente descrito e estudado na família dos ativadores transcricionais, para estudos com zinco, cobre, cádmio e chumbo (Permina et al., 2006). Tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas resistentes ao mercúrio o *merR* exerce o papel de regulador. O modelo atual de ativação do *merR* para a expressão dos genes *mer* é baseado nas estruturas do metal, tanto para mercúrio como para zinco e cobre (ZntR e CueR). Este mecanismo de repressão da expressão na ausência de Hg^{+2} e ativação da expressão na presença de Hg^{+2} conduz a uma indução altamente sensível da transcrição, em resposta ao aumento dos níveis de mercúrio no meio (Silver & Hobman, 2007). Em muitos operons um gene adicional comanda a regulação negativa do processo, no caso do operon *mer* é realizada pelo gene *merD* (Osborn et al, 1999; Silver & Hobman, 2007).

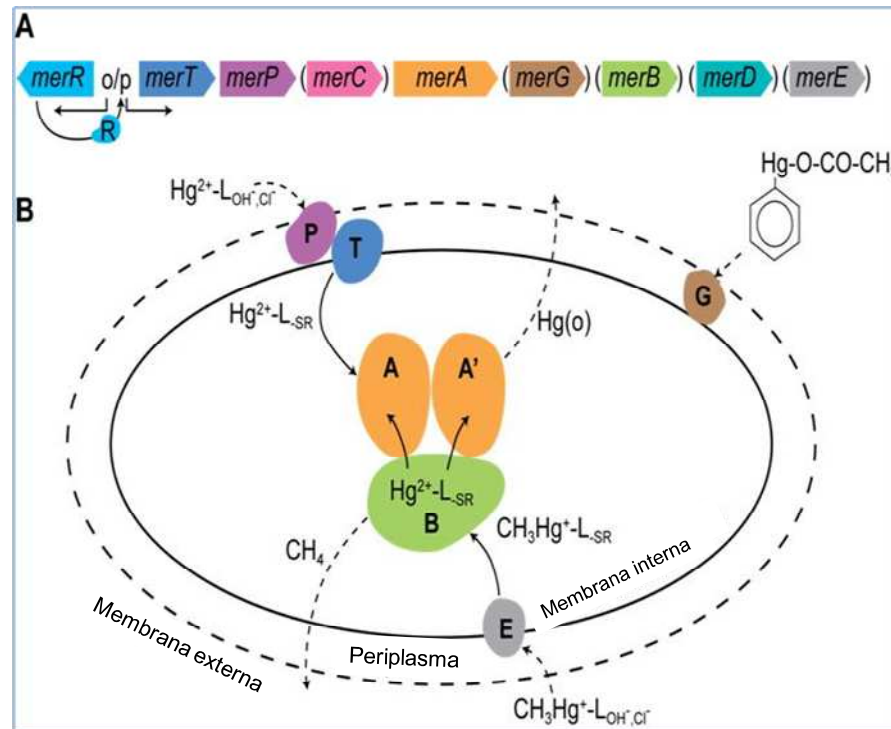


Figura 1.2. Mecanismo de resistência ao mercúrio coordenado pelos genes *mer* (adaptado de Barkay et al., 2003)

Quando o mercúrio encontra-se na forma inorgânica os íons de mercúrio (Hg^{+2}), são ligados no periplasma das bactérias gram-negativas e na membrana citoplasmática de gram-positivas, onde são seqüestrados por um par de resíduos de cisteínas da *merP*. Então são importados para o citoplasma por transportadores específicos de membrana (*merT*, *merC* ou *merF*). MerE é uma proteína de membrana com função ainda desconhecida (Silver e Phung, 2005). O *merP* transfere o Hg^{+2} para duas das quatro cisteínas da proteína de membrana interna *merT*, por meio de um mecanismo de potencial redox do par de cisteínas do *merT*, antes de ser transferido para o par de cisteínas do domínio N-terminal da *merA* (Silver, 2007; Osborn, 1997). Após o transporte, o mercúrio que se encontra na forma Hg^{+2} é reduzido a Hg^0 pela ação da enzima mercúrio redutase codificada pelo gene *merA* (Silver & Hobman, 2007). Estas cisteínas são necessárias para a atividade enzimática celular (Barkay, 2003), mas podem ser inibidas por alguns substratos de Hg^{+2} (Engst & Miller, 1999). Embora *merT* seja encontrada com mais freqüência no operon *mer*, outros transportadores

alternativos de membrana ou proteínas são encontrados, tais como *merG* e *merE*. Após o transporte, o mercúrio que se encontra na forma Hg^{+2} é reduzido a Hg^0 pela ação da enzima mercúrio redutase codificada pelo gene *merA* (Silver & Hobman, 2007).

O transporte de compostos organomercuriais para o interior da célula pode ocorrer por um mecanismo diferente do que ocorre com o mercúrio inorgânico. Pressupõem-se que os compostos organomercuriais são lipossolúveis e que podem passar pela membrana celular por simples difusão (Barkay et al., 2003). Não se sabe ao certo, se os genes *merT* e *merP* estão envolvidos no transporte e absorção dos compostos organomercuriais para o citoplasma. Assim, outros mecanismos de transporte podem estar envolvidos como os genes *merE* e *merG* (Barkay et al., 2003) (Figura 1.2).

Quando no interior da célula microbiana, os organomercuriais são clivados a mercúrio inorgânico, quando na presença da enzima organomercurio liase codificada pelo gene *merB*. Os produtos da clivagem geram Hg^{2+} e outros compostos, como o metano gerado a partir da quebra de metilmercúrio e benzeno a partir de fenilmercúrio (Silver e Phung, 2005, Silver & Phung, 1996; Barkay et al., 2003). A reação enzimática para substratos organomercuriais é um ataque concentrado de prótons na ligação C-Hg inicialmente vinculado a um resíduo tiol da cisteína (Begley & Eaclick, 2004). Então, o Hg ligado ao substrato organomercurial é liberado na forma de Hg^{+2} e transferido por meio de tiois solúveis ou talvez diretamente ao domínio C-terminal da mercúrio redutase, onde é transformado a Hg^0 (Figura1.2).

2.6 Considerações Gerais

O mercúrio é considerado um dos poluentes de mais alta prioridade para monitoramento e controle no ambiente. O mercúrio pode, através de reações químicas sofridas durante alguns processos industriais, originar o metilmercúrio, um sub-produto altamente tóxico e nocivo ao ambiente, animais e humanos. O mercúrio pode também, ser convertido no ambiente

por processos bióticos e abióticos, originando metilmercúrio e dimetilmercúrio. Por ser mais facilmente formado, a presença de metilmercúrio no ambiente é muito preocupante, por ser uma substância potencialmente neurotóxica e pela possibilidade de biomagnificar na cadeia alimentar, podendo afetar os animais e o homem.

Nos últimos anos, os órgãos governamentais tem aumentado as exigências para evitar a contaminação do meio ambiente por metais pesados. As autoridades tem também exigido o desenvolvimento de métodos para redução de impactos, caso acidentes venham a ocorrer, impactando no meio ambiente. Entre estas técnicas, a biorremediação causa baixo impacto ao ambiente e busca utilizar recursos existentes na própria natureza, tais como: bactérias, fungos, plantas, que sejam capazes de crescer em ambientes contaminados e transformar os contaminantes. No caso do mercúrio, a biorremediação contribui para transformar formas mais tóxicas desse metal, como metilmercúrio (CH_3Hg), em formas menos tóxicas (Hg^0). Para isto, os micro-organismos resistentes ao mercúrio, utilizam mais comumente o mecanismo de redução enzimática baseado nos genes *mer*.

Lodo de esgoto, solos reconstruídos de minas de carvão, “*landfarming*” e “*lanspreading*” de lodos e efluentes contaminados podem constituir importantes fontes de mercúrio e estes podem potencialmente dar origem a metilmercúrio. O isolamento de micro-organismos resistentes à este composto, o estudo das condições ótimas de crescimento, determinação do efeito do stress, avaliação dos genes *mer* envolvidos na transformação e o estudo com $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$ para avaliar a emissão de $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$, constituem-se ferramentas importantes para determinar-se o potencial de uso destes micro-organismos em processos de biorremediação.

2.7 Referências Bibliográficas

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v.1, p.299-351, 2000.

AMYOT, M.; GILL, G.A.; MOREL, F.M. Production and loss of dissolved gaseous mercury in coastal seawater. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.31, n.12, p.3606-3611, 1997.

BALTISBERGER, R.J.; GRIEBLE, D.; BALLINTINE, T.A. A study of the disproportionation of mercury(I) induced by gas sparging in acidic aqueous solutions for cold-vapor atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.111, p.111-122, 1979.

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

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

BARNES, H.L.; SEWARD, T.M. Geothermal systems and mercury deposits. In: **GEOCHEMISTRY of Hydrothermal Ore Deposits**. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, 1997. p. 699-736.

BARBOSA, A.M.; GIESE, E.C.; COVIZZI, L.G. Biodegradação de compostos aromáticos. In: **MICROBIOLOGIA ambiental**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 84 -107.

BEGLEY, T.P.; WALTS, A.E.; WALSH, C.T. Bacterial organomercurial lyase: overproduction, isolation and characterization. **Biochemistry**, Washington, v. 25, n.22, p.7186-7192, 1986a.

BEGLEY, T.P.; WALTS, A.E.; WALSH, C.T. Mechanistic studies of a protonolytic organomercurial cleaving enzyme: bacterial organomercurial lyase. **Biochemistry**, Washington v.25, n.22, p. 7192-7200, 1986b.

BOYD, E.S.; CUMMINGS, D.E.; GEESEY, G.G. Mineralogy influences structure and diversity of bacterial communities associated with geological substrata in a pristine aquifer. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.54, n.1, p.170–182, 2007.

BURGESS, N.M.; MEYER, M.W. Methylmercury exposure associated with reduced productivity in common loons. **Ecotoxicology**, Amsterdam, v.17, p.83–91, 2008.

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

CHASAR, L.C. et al. Mercury cycling in stream ecosystems. 3. Trophic dynamics and methylmercury bioaccumulation. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.43, n.8, p.2733–2739, 2009.

CHOI, S.C.; CHASE, J.T.; BARTHA, R. Metabolic pathways leading to mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans* LS. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.11, p.4072-4077, 1994.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds **Critical Reviews in Toxicology**, New York, v.36, n.8, p.609–662, 2006.

CLARKSON, T.W. The three modern faces of mercury. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, N. C, v.110, n.6, p.11-23, 2002.

CLARKSON, T.W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Oxford, v. 34, n.4, p.369-403, 1997.

COLE, D.C. et al. Blood mercury levels among Ontario anglers and sport-fish eaters. **Environmental Research**, Amsterdam, v.95, n.3, p.305–314, 2004.

COMPEAU, G. C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: principle methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, n.2, p. 498-502, 1985.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 375, de 29 de agosto de 2006. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n.167, de 30/08/2006, seção 1, p.141-146.

DEVARS, S. et al. Mercury uptake and removal by *Euglena gracilis*. **Archives of Microbiology**, New York, v.174, n.3, p.175-180.

DRISCOLL, C.T. et al. The role of dissolved organic carbon in the chemistry and bioavailability of mercury in remote Adirondack lakes. **Water Air Soil Pollution**, Grécia, v. 80, n.1-4, p.499–508, 1995.

ENGST, S.; MILLER, S. M. Alternative routes for entry of HgX₂ into the active site of mercuric ion reductase depend on the nature of the X ligands. **Biochemistry**, Washington, v.38, n.12, p.3519-3529, 1999.

EVERS, D.C. et al. Adverse effects from environmental mercury loads on breeding common loons. **Ecotoxicology**, Netherlands, v.17, n.2, p.69–81, 2008.

FALTER, R. Experimental study on the unintentional abiotic methylation of inorganic mercury during analysis: part 1: localization of the compounds electing the abiotic mercury methylation. **Chemosphere**, Oxford, v.39, n.7, p.1051-1073, 1999.

GILMOUR, C.C.; HENRY, E.A.; MITCHELL, R. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.26, n.11, p.2281-2287, 1992.

GOCHFELD, M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.56, n.1, p.174-179. 2003.

GILBERTSON, M.; CARPENTER, D.O. An ecosystem approach to the health effects of mercury in the Great Lakes basin ecosystem. **Environmental Research**, Amsterdam, v.95, n.3, p.240–246, 2004.

IMM, P.; KNOBELOCH, L.; ANDERSON, H.A. Great Lakes Sport Fish Consortium Fish consumption and advisory awareness in the Great Lakes Basin. **Environmental Health Perspectives**, The Research Triangle Park, v.113, n.10, p.1325–1329, 2005.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. **World Energy outlook 2007** : China and India Insights. Disponível em: <http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2007/weo_2007.pdf> Acesso em: Jan 25, 2012

JACQUES, R.J.S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Belo Horizonte, v.37, p.1192-1201, 2007.

JIANG, G-B.; SHI, J-B; FENG, X-B. Mercury pollution in China An overview of the past and current sources of the toxic metal. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.40, n.12, p.3673-3678, 2006.

JENSEN, S.; JERNELÖV, A. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. **Nature**, London, v.223, n.5207, p.753-754, 1969.

KABATA-PENDIAS, A; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. 3th ed. Boca Raton: CRC Press, 1986. 365p.

KEIN, A.S. et al. Regeneração natural em área degradada pela mineração de carvão em Santa Catarina, Brasil. **REM: Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v.62, n.3, p.297-304, 2009.

LINDBERG, S.E. et al. Dynamic oxidation of gaseous mercury in the Arctic troposphere at polar sunrise. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.36, n.6, p.1245-1256, 2002.

LOVELY, D. R.; COATES, J. D. Bioremediation of metal Contamination. **Current Opinion Biotechnology**, Amsterdam, v.8, n. 3, p.285-287, 1997.

MAGOS, L. ; CLARKSON, T.W. Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 27, n.9, p.1373-1377, 1978.

MATTIAZZO, M.E.; ANDRADE, C.A. Aplicabilidade do biossólido em plantações florestais. IV. Lixiviação de N inorgânico e toxicidade de metais pesados. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A (Eds). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. p.203-213.

MASON, R.; FITZGERALD, W. The global mercury cycle: Oceanic and anthropogenic aspects. In: BAEYENS, W.; EBINGHAUS, R.; VASILIEV, O. (Eds.) **Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances**. Dordrecht: Kluwer Academic. 1996. p.85-108.

MERGLER, D. et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. **Ambio**, Estocolmo, v.36, n.1, p.3-11, 2007.

MICARONI, R. C. C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIN, W. F. Compostos de mercúrio, revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.4, p. 487 – 495, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O . **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p.729.

MUCELIN, C.A.; BELLINI, M. Lixo e impactos ambientais perceptíveis no ecossistema urbano. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v.20, n.1, p. 111-124. 2008.

NASCIMENTO, E. S.; CHASSIN, A. M. Ecotoxicologia do mercúrio e seus compostos. **Caderno de referências ambiental**, Salvador: CRA, v.1, 2001. 176 p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Toxicological Effects of Methylmercury**. Washington, DC, National Academy Press, 2000.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v.51, n.6, p.730–750, 1999.

NOGUEIRA, A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In:SIQUEIRA, J.O. (ed) **Avanços em fundamentos e aplicação de micorrizas**. Lavras: UFLA, 1996. p.135-174.

NRIAGU, J.O. Mechanistic steps in the photoreduction of mercury in natural waters. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.154, n.1, p. 1-8. 1994.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Guanabara, S.A., 1988. 434p

OGUNSEITAN, O.A. Protein method for investigating mercuric reductase gene expression in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n.2, p.694-702, 1998.

OLIVEIRA, A.S.O. et al. Heavy metals in untreated/treated urban effluent and sludge from a biological wastewater treatment plant **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin v.14, n.7, p.483-489.

OLIVEIRA, M.L.S. et al. Mineralogy and leaching characteristics of beneficiated coal products from Santa Catarina, Brazil. **International Journal of Coal Geology**, Amsterdam, v.94, p. 314-325, 2012.

OREMLAND, R.; CULBERTSON, C.W.; WINFREY, M.R. Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures:Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 1, p. 130-137, 1991.

OSBORN, A. M. et al. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam v.19, n.4, p.239-262, 1997.

PACYNA, J. M. et al. E.G. Mercury emissions from anthropogenic sources: Estimatives and measurements for Europe. In: PIRRONE, N.; MAHAFFEY, K. (Ed). **Dynamics of mercury pollution on regional and global scales – Atmospheric process and human exposures around the world**. New York: Springer, 2005. p. 51-64.

PAULA, A. M.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Biomassa, atividade microbiana e fungos micorrízicos em solo de “landfarming” de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.10, n.2, p.448-455, 2006.

PFEIFFER, W. C. et al. A ameaça do mercúrio nos garimpos. **Ciência Hoje**, Belo Horizonte, v. 11, p.61, p. 10-12, 1990.

PHELPS, D.; BUSECK, P.R. Distribution of soil mercury and the development of soil mercury anomalies in the Yellowstone geothermal area, Wyoming. **Economic Geology**, Littleton, v.75, n.5, p.730–741, 1980.

PIRES, M. M. A. **Uso agrícola do lodo de esgoto: aspectos legais**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. p.4.

PIRES, M.; QUEROL, X. Characterization of Candiota (South Brazil) coal and combustion by-product. **International Journal of Coal Geology**, Holanda, v. 60, n.1, p. 57-72, 2004.

ROLFHUS, K.R. et al. Assessment of mercury bioaccumulation within the pelagic food web of lakes in the western Great Lakes region. **Ecotoxicology**, Netherlands, v.7, p.1520-1529, 2011.

SANDHEINRICH, M.B.; WIENER, J.G. Methylmercury in freshwater fish: recent advances in assessing toxicity of environmentally relevant exposures. In: BEYER, W.N.; MEADOR, J.P. (Ed.). **Environmental contaminants in biota: interpreting tissue concentrations**. Boca Raton: CRC Press, FL, 2011. p.169–190.

SCHEUHAMMER, A.M. et al. Effects of environmental methylmercury on the health of wild birds, mammals, and fish. **Ambio**, Estocolmo, v.36, n.1; p.12–18, 2007.

SCHEUHAMMER, A.M. et al. Toxicology of mercury in fish and wildlife: recent advances. In: BANK, M. (Ed). **Mercury in the environment: pattern and process**. Berkeley, CA: University of California Press, 2001.

SEABRA, P.N. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. In: **MICROBIOLOGIA Ambiental**. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 2008. p. 548-570.

SELLERS, P. et al. Photodegradation of methylmercury in lakes. **Nature**, London, v.380, n. 6576, p.694-697, 1996.

SILVER, S.; PHUNG, L.T. A bacterial view of the Periodic Table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, New York, v.32, n.11-12, p.587-605, 2005.

SILVER, S.; HOBMAN, J. L. Mercury microbiology: Resistance systems, Environmental aspects, methylation and human health. **Molecular Microbiology of Heavy Metals**, New York, v.6, p. 358-369, 2007.

SMITH, T. et al. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg (0). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v, 64, n.4, p.1328-1332, 1998.

SOUZA, R. A. S. et al. Extração sequencial de zinco e cobre em solos tratados com lodo de esgoto e composto de lixo. **Quimica Nova**, São Paulo, v. 35, n.2, p.308-314, 2012.

SUDA, I.; SUDA, M.; HIRAYAMA, K. Degradation of methyl and ethyl mercury by singlet oxygen generated from sea water exposed to sunlight or ultraviolet light. **Archives of Toxicology**, New York, v. 67, n.5, p.365-368, 1993.

SWAIN, E.B. et al. Socioeconomic consequences of mercury use and pollution. **Ambio**, Estocolmo, v.36, n. 1, p. 45–61, 2007.

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

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Water Quality Criterion for the Protection of Human Health: Methylmercury**. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, 2001.303 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **EPA Guidelines. Soil bioremediation. EPA 589/05**. Washington, DC, 2005. p.1-9.

VANGRONSVELD, J.; RUTTENS, A. In-situ reclamation techniques for heavy metal contaminated soils. In: INTER-RELACAO fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p.389-404.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; SÁ, M.H.B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 604p.

VON BURG, R.; TAYLOR, D. E. Plasmid mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. **Plasmid**, Amsterdam, v.27, n.1, p. 56-64, 1991.

WEBER, J.H. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. **Chemosphere**, Amsterdam, v.26, n.11, p.2063-2077, 1993.

WEDEPOHL, K.K. The composition of the continental crust. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v.59, n.7, p.1217-1232, 1995.

WIENER, J.G.; KRABBENHOFT, D.P.; HEINZ, G.H.; SCHEUHAMMER, A.M. Ecotoxicology of mercury. In: HANDBOOK of ecotoxicology. Boca Raton, FL: CRC Press, 2003. p. 409–463.

WHO – INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY. **Methylmercury:** environmental health criteria. Geneva: World Health Organization, 1990. p. 101-144.

CAPÍTULO II

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO METILMERCÚRIO E REMOÇÃO DESTE COMPOSTO POR *Pseudomonas putida* V1

3.1 INTRODUÇÃO

A contaminação por mercúrio devido às atividades antrópicas, descarte e uso crescente de produtos industrializados, medicinais e domésticos que contenham este elemento é um problema grave, com grandes impactos à qualidade do ambiente e da saúde (Jan et al., 2009; Tazisong e Senwo 2009; Chien et al., 2010). Em humanos, a exposição ao mercúrio ocorre principalmente através da respiração e contato com a pele e/ou pela ingestão de alimentos contaminados (Jan et al., 2009). Entre as diferentes formas de mercúrio que contaminam o meio ambiente, o mercúrio orgânico que é encontrado geralmente como metilmercúrio (CH_3Hg), é adsorvido nos componentes lipídicos da célula de animais aquáticos, com grande potencial de exposição e contaminação de humanos (Nam e Basu, 2011). Esta forma orgânica de mercúrio é o principal meio de acumulação em peixes e em seus consumidores, causando alguns tipos de doenças neurodegenerativas (Harada, 1995).

O metilmercúrio é formado principalmente em lagos ou em sedimentos anaeróbios pela ação de bactérias redutoras de sulfato, que são reconhecidas como as principais metiladoras encontradas nestes locais (Compeau e Bartha, 1985; Gilmour et al., 1992). Devido a este fato, poucos estudos relatam o isolamento de bactérias do solo, resistentes ao metilmercúrio (Olson et al. 1991). O metilmercúrio também está presente ou pode ser formado em várias atividades industriais, urbanas e extrativistas,

com grande potencial de contaminação do ambiente e de intoxicar os organismos presentes.

Micro-organismos necessitam de metais para atuar como cofator enzimático, sendo essenciais ao metabolismo em baixas concentrações. Entretanto, alguns metais como o mercúrio não apresentam nenhuma função fisiológica específica e são altamente tóxicos para os micro-organismos e humanos (Camargo et al. 2007). O crescimento de micro-organismos em ambiente contaminado com este elemento tem levado ao desenvolvimento de mecanismos de tolerância e resistência. Associa-se a isso a grande diversidade genética e metabólica de micro-organismos no ambiente, com capacidades distintas para degradar ou transformar os contaminantes em substâncias inertes (Silver e Phung, 2005). O isolamento de micro-organismos em locais contaminados por metilmercúrio, a sua identificação e a determinação de sua capacidade de degradar o metilmercúrio constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de técnicas de biorremediação. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias tolerantes ao metilmercúrio e avaliar o potencial de remoção deste composto.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras: as amostras foram coletadas em solos de áreas de *landfarming*, *landspreading* e em solos reconstruídos com despejos de processos extrativistas no Rio Grande do Sul. Também foram coletadas amostras de lodo do Sistema de Tratamento de Resíduos do Laboratório de Análises de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Sub-amostras de solo (n = 4 – 5/amostra) foram coletadas a 10 cm de profundidade em intervalos de 5 m usando uma grade medindo 10 m x 10 m e um trado holandês (5 cm de diâmetro; Eijkelkamp, Holanda). Sub-amostras do lodo foram coletadas utilizando espátula limpa e esterilizada. As sub-amostras foram combinadas e a amostra final pesava aproximadamente 2-3 kg. A caracterização química de solos e do lodo de esgoto é apresentada na Tabela 2.1. O pH foi determinado em água e a matéria orgânica por combustão úmida pelo método Walkley-Black (Tedesco et al., 1995). Para determinação de cobre, zinco, cádmio e chumbo realizou-se digestão ácida nítrico – perclórica das amostras e determinou-se por espectrofotometria de absorção atômica (Tedesco et al., 1995). Enquanto que para o mercúrio procedeu-se a digestão da amostra pelo método de EPA 7471B e determinou-se por espectrofotometria de absorção atômica/vapor frio.

Isolamento e identificação de bactérias resistentes ao metilmercúrio: O isolamento de bactérias resistentes de metilmercúrio foi realizado utilizando-se o método de enriquecimento. Amostras de solo (0,1 g) ou de lodo (0,1 mL) foram adicionadas a 20 mL de caldo de Luria Bertani (LB) (g/L: peptona, 10; de extrato de levedura, 5; NaCl, 10) contendo diferentes

concentrações de 2,7; 4,1; 5,0; 5,5; 8,7; 9,2; 9,6 à 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio e foram incubadas por 24 horas a 29 °C (Takeuchi et al, 2005). Após 24 h, 1 mL de cultura enriquecida foi transferido para tubos contendo 9 ml caldo LB e as concentrações de metilmercúrio e foram incubadas por 24 horas a 29 °C, esse procedimento foi realizado três vezes consecutivas. Em seguida, uma alíquota de 30 μL da cultura de enriquecimento foi espalhada em ágar LB suplementado com 2,7; 4,1; 5,0; 5,5; 8,7 e 9,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio, seguido de incubação a 29 °C por 24 h. Colônias que mostraram diferentes características morfológicas (Holt et al., 1994) foram purificadas através de três repiques consecutivos em meio Lb e então submetidas ao seqüenciamento 16S rRNA.

Tabela 2.1. Características químicas dos solos e lodo de esgoto estudados.

Características	Locais contaminados				VO ^a
	S1	S2	S3	S4	
pH (H ₂ O)	6,7	6,4	3,9	4,5	
Matéria orgânica (g kg ⁻¹)	5,1	>10	1,2	2,9	
Mercúrio (mg kg ⁻¹)	13	3,1	1,4	0,05	0,05
Cobre (mg kg ⁻¹)	28	32	86	1,4	35
Zinco (mg kg ⁻¹)	127	560	52	0,8	60
Cádmio (mg kg ⁻¹)	<0,2	0,6	<0,2	0,2	<0,5
Chumbo (mg kg ⁻¹)	67	32	8	13,5	60

S1: *Landspreading*; S2: *Landfarming*; S3 – Lodo de esgoto; S4: solo reconstruído mina de carvão; VO^a: Valores orientadores de qualidade do solo (CETESB, 2005).

Análise de seqüenciamento 16S rRNA: o DNA genômico bacteriano foi extraído utilizando-se o kit de purificação de DNA *Wizard Genomic DNA Purification*, utilizando os *primers* universais para bactérias: 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') para a amplificação de 16S rRNA em PCR.

A reação de amplificação foi conduzida de acordo com Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações com o intuito de aumentar a eficiência da amplificação utilizando-se o seguinte protocolo: tampão de reação (50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl, pH 9,0, 50 mmol L⁻¹ de KCl, 2,5% de Triton X 100), dNTPs (200 µmol L⁻¹ de cada um), 0,2 µmol L⁻¹ de MgCl₂, 0,25 pmol L⁻¹ mol de cada primer, 0,8 ng/ µL de amostra de DNA e 0,02 U de Taq DNA polimerase. A amplificação foi realizada em um ciclador térmico (MJ Research Inc. Watertown, MA, USA) e o programa básico continha 35 ciclos (desnaturação inicial a 95°C por 5 min, desnaturação subsequente a 95°C por 30s, anelamento a 50 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final por 5 min a 72 °C). Os produtos de PCR foram purificados pelo método padrão de precipitação com PEG 8000 (polietileno glicol). As reações de sequenciamento dos fragmentos de PCR ocorreram, utilizando os kits de terminadores marcados da GE Healthcare com oligonucleotídeo iniciador 519r (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3').

Todas as seqüências geradas foram analisadas com o uso do banco de dados Genbank/NCBI. As seqüências dos genes 16S rRNA de cada cepa bacteriana isolada foram utilizadas para determinar o gênero e espécie mais relacionada usando o BLASTN (Altschul et al.,1990). As seqüências foram alinhadas usando ClustalX (Versão 1.83) (Thompson et al., 1994). A árvore filogenética foi avaliada usando o método de Neighbor-Joining com o programa PHYLO_WIN (Galtier et al., 1996). Sequências de referência de 16S RNAr de bactérias presentes em solo que representam os principais grupos de bactérias desse estudo obtidos do GenBank foram incluídas na análise filogenética.

Concentração inibitória mínima (CIM) e tolerância a metais:

todos os isolados bacterianos foram avaliados quanto à sua capacidade de crescer em meio LB contendo diferentes concentrações de metilmercúrio. A cepa bacteriana que apresentou alta capacidade de remoção de metilmercúrio foi avaliada quanto a tolerância à outros metais: cobre, chumbo, níquel, cromo, zinco, cobalto, manganês e bário em meio LB e meio mínimo. O meio mínimo continha [(g L⁻¹): 8,0 de sacarose, 1,0 de (NH₄)₂SO₄, 2,0 de

K_2HPO_4 , 0,5 de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,1 de NaCl, 0,5 de levedura, 0,5 de $CaCO_3$]. Todos os testes foram realizados em placas com 96 poços, sendo que cada poço continha 200 μL de meio de cultura. As concentrações de metilmercúrio variaram de 0 ou 15 $\mu mol L^{-1}$ (CH_3Hg), enquanto que para outros metais, as concentrações variaram de 0 e 1100 $\mu mol L^{-1}$, utilizando os seguintes compostos: $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, $(C_2H_3O_3)_2Pb \cdot 3H_2O$, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, CrK_2O_4 , $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, $BaCl_2$. Cada poço foi inoculado com 5 μL de pré-inóculo e as placas foram incubadas a 29°C por 72 horas. A menor concentração de metilmercúrio e outros metais na qual nenhum crescimento visível foi observado foi considerada como a concentração inibitória mínima (CIM) (Ball, 2007; Murtaza et al., 2002). Meio LB não inoculado serviu como controle negativo e meio LB inoculado sem metilmercúrio e outros metais como controle positivo.

Capacidade de remover metilmercúrio dos meios de cultura:

os isolados bacterianos foram cultivados em caldo LB contendo metilmercúrio (2,3 $\mu mol L^{-1}$) a 29°C por 24 horas. Os inóculos foram padronizados pela densidade óptica ($DO_{600} = 0,05$ à 0,45), dependendo do isolado bacteriano, seguido de incubação a 29°C por 24 h à uma velocidade de 100 rpm. Os frascos com meio de LB não inoculado serviram como controles negativos. A remoção de metilmercúrio a partir de meio LB inoculado foi medida e relacionada com o crescimento celular (DO). Leituras de densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) foram realizadas, utilizando-se um Spectronic 20, GENESYS™ (Spectronic Analytical Instruments, Rochester, NY).

O isolado bacteriano que apresentou a maior capacidade de remoção de metilmercúrio foi inoculado em meio LB contendo diferentes concentrações de metilmercúrio: concentração baixa, 2,3 $\mu mol L^{-1}$, concentração inibitória mínima, 11,5 $\mu mol L^{-1}$ e concentração biocida igual a 12 $\mu mol L^{-1}$. Os experimentos foram realizados como descrito anteriormente. Para avaliar o efeito do pH na remoção de metilmercúrio e crescimento de *P. putida* V1, esta bactéria foi inoculada em meio de cultivo com pH variando de 3 a 11, seguido de incubação a 29°C por 24 h à uma velocidade de 100 rpm. O pH do meio de cultivo foi tamponado com tampão acetato (para pH <5,0),

tampão fosfato de sódio (para 5,0-8,0) e tampão Tris-HCl (para pH > 7,0). O efeito da temperatura na remoção de metilmercúrio foi avaliado em meio LB com as temperaturas variando entre 10 a 40 °C. Para a medição do pH, após incubação, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm e medido utilizando um potenciômetro (Digimed DM-22, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos como percentual de remoção de metilmercúrio e a densidade óptica em DO_{600nm} .

A concentração de metilmercúrio remanescente do meio de cultura inoculado com os isolados bacterianos foi determinada a partir da digestão da amostra pelo método de EPA 7471B. Toda a vidraria utilizada durante as análises de mercúrio foi limpa em uma solução contendo 30% de HNO_3 e enxaguada várias vezes em água ultra pura antes do uso. Uma alíquota de 0,2 mL de sobrenadante do meio LB foi coletada e adicionada a 5 ml de ácido sulfúrico concentrado e 2 mL de ácido nítrico concentrado. Em seguida, 10 mL de uma solução de permanganato de potássio (5%) foram adicionados aos tubos, seguido de autoclavagem por 15 minutos à 121°C e pressão de 1,5 atm. O permanganato de potássio restante foi reduzido com 6 ml de cloridrato de hidroxilamina a 12%. A análise de mercúrio foi realizada em um espectrômetro de absorção atômica com geração de vapor frio (Analyst 100, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Análise estatística: os experimentos foram realizados em triplicata e as médias e os desvios-padrão ($N-1$) foram calculados. Os resultados foram submetidos ao teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) usando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A árvore filogenética do sequenciamento dos genes 16S rRNA mostra a similaridade dos 16 isolados bacterianos obtidos de diferentes locais de amostragem no Rio Grande do Sul (Figura 2.1). Todos os isolados pertenciam ao filo Gamaproteobacteria ou Firmicutes, sendo dois deles (P1(B) e COMP.1,0) agrupados como *Bacillus cereus*. Este micro-organismo já foi anteriormente isolado e caracterizado por sua capacidade de degradar polietileno e absorver metais pesados a partir de solo contaminado (Hryniewicz et al., Genbank: HM989916.1 e Heera et al., Genbank: HQ185283.1 – ambos não publicados).

Os isolados identificados como B50B, B50D, M10OB foram agrupados com *Pseudomonas* sp. (Khan et al., 2002; Lang, et.al., 2007). Os isolados C50B e V1 foram relacionados com *P.putida*, este micro-organismo já foi anteriormente isolado e caracterizado por sua capacidade de degradar o catecol, enquanto que o isolado B50A foi agrupado com *P. parafulva* (Uchino, 2001). Três isolados (B50C, M25B e M25A) foram agrupados com *Enterobacter* sp. (Takebayashi et al., 2007) e os demais isolados (M25C, P1.0(A) e P0.5) foram agrupados com *Serratia* sp. (Indiragandh et al., 2007) e L1.0 e L1.7 com *Providencia alcalifancies* (Liu et al., Genbank: AY994312.1 não publicado).

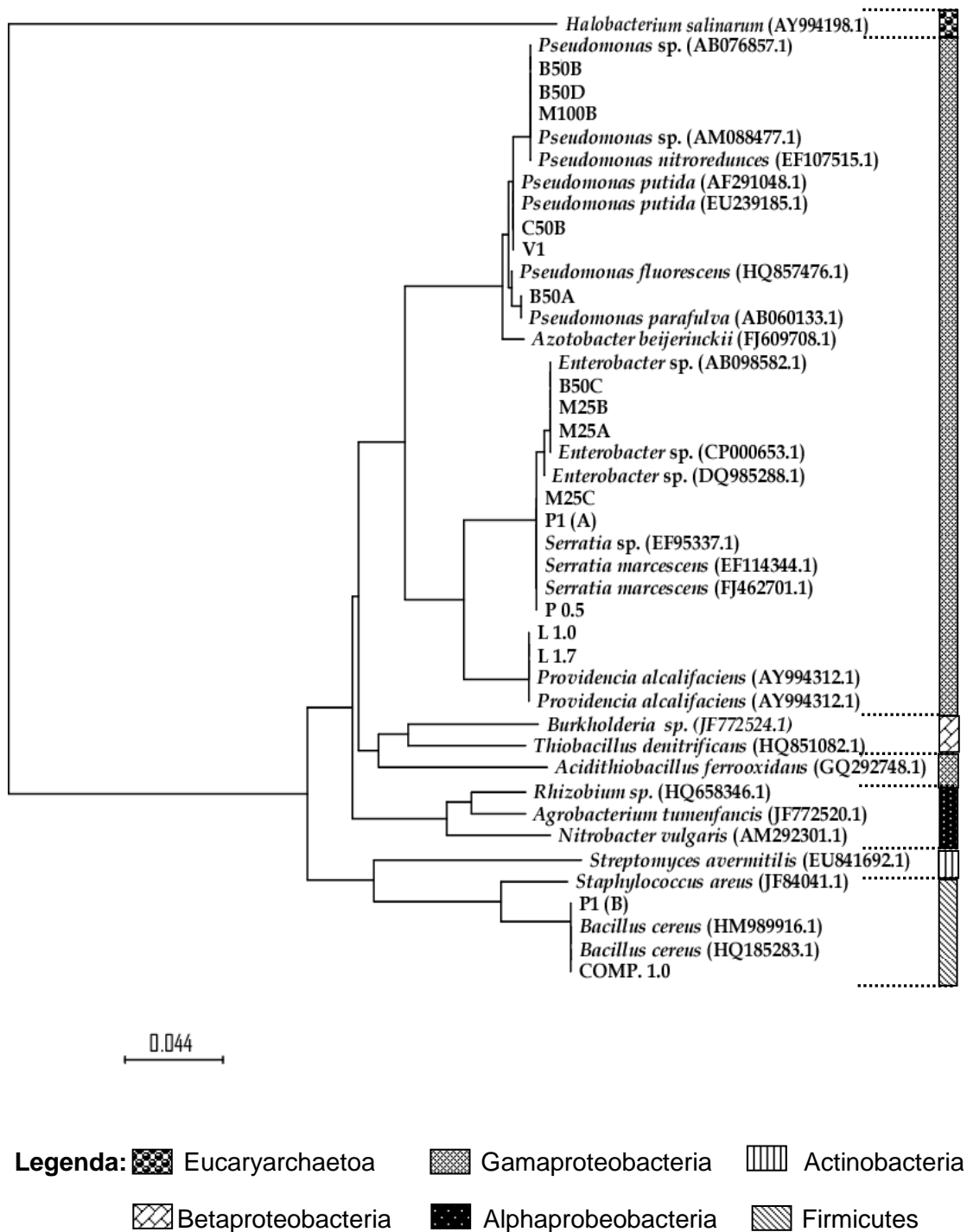


Figura 2.1. Árvore filogenética das 16 bactérias isoladas de locais contaminados com mercúrio. A árvore neighbor-joining foi construída utilizando-se as sequências do gene 16S rRNA obtidas pelo seqüenciamento dos produtos de PCR e sequências referências de bactérias de solo obtidas no Genbank.

A predominância de *Pseudomonas* spp tolerantes ao mercúrio entre os isolados bacterianos observados neste estudo também foi relatada em estudos realizados na China, Índia e Europa (Nakamura et al., 1988; Nakamura et al., 1999; Canstein et al., 1999; Fortunato, et al., 2005; Tupe et al., 2007). Esse fato sugere que nesses países, *Pseudomonas* sp. prevalece nos locais contaminados por mercúrio. Outros gêneros como *Enterobacter*, *Serratia* e *Proteus* são encontrados com menor frequência em ambientes contaminados por esse metal, mas alguns estudos têm demonstrado que espécies representativas desses gêneros possuem resistência e habilidade para remover o mercúrio (Griffin et al., 1985; Henriette et al., 1991; Giovanella et al., 2011).

Vários estudos têm relatado a incidência de espécies do gênero *Bacillus* em ambientes contaminados por esse metal. Estudos anteriores encontraram este gênero nos sedimentos da baía de Minamata, Japão (Narita et al., 2003) e no estuário de Urías, Sinaloa, México (Green-Ruiz, 2006), bem como em biofilmes coletados em fontes termais na Bagni di Filippo, Toscana, Itália, as quais são naturalmente enriquecidas com mercúrio (Chatziefthimiou et al 2007).

Quando se avaliou a relação entre os microrganismos isolados e a origem dos resíduos, verificou-se que sete isolados foram obtidos a partir do lodo de esgoto do Sistema de Tratamento de Rejeitos do Laboratório de Análises do Solo da UFRGS. Quatro isolados foram obtidos de amostras de solo de landspreading e apenas um isolado foi encontrado nas amostras de *landfarming*. Quatro isolados bacterianos foram obtidos a partir de amostras de solo da área com solo reconstruído de mina de carvão (Tabela 2.2).

Tabela 2.2. Identificação das cepas bacterianas de diferentes locais contaminados baseadas no gene 16S rRNA e a concentração mínima inibitória (CIM) de metilmercúrio.

Locais contaminados	Cepas	Similaridade (%) (gene 16S rRNA)	CIM (μM)
<i>Landspreading</i>	B50A	<i>Pseudomonas</i> sp.(99%)	2,7
	B50B	<i>Pseudomonas</i> sp. (100%)	2,7
	B50C	<i>Enterobacter</i> sp. (99%)	4,1
	B50D	<i>Pseudomonas</i> sp. (100%)	4,1
<i>Landfarming</i>	V1	<i>Pseudomonas putida</i> (100%)	11,5
Lodo de esgoto	M25A	<i>Enterobacter</i> sp. (99%)	5,0
	M25B	<i>Enterobacter</i> sp. (100%)	5,5
	M25C	<i>Serratia marcescens</i> (100%)	5,5
	M100B	<i>Pseudomonas</i> sp. (100%)	5,5
	C50B	<i>Pseudomonas putida</i> (100%)	5,0
	L1.0	<i>Providencia alcalifaciens</i> (100%)	9,2
	L1.7	<i>Providencia alcalifaciens</i> (100%)	9,2
Solo reconstruído	P 0.5	<i>Serratia</i> sp. (99%)	8,7
	P1(A)	<i>Serratia</i> sp. (99%)	9,2
mina de carvão	P1(B)	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	9,6
	CP1.0	<i>Bacillus cereus</i> (100%)	5,0

O baixo número de isolados bacterianos encontrados no *landspreading* ($n = 4$) e *landfarming* ($n = 1$), se deve provavelmente às concentrações elevadas de mercúrio nesses locais quando em comparação com as outras áreas (Tabela 2.2). Os valores estabelecidos pelos Padrões Brasileiros de Qualidade dos Solos estabelece uma concentração de $0,05 \text{ mgL}^{-1}$ de mercúrio como padrão de qualidade (CETESB, 2005). Somente na área de *landspreading* foi encontrada uma concentração 260 vezes maior (13

mg L⁻¹) do que o valor de qualidade dos solos; já na área de *landfarming* foi encontrada uma concentração 62 vezes maior que o permitido legalmente (3,1 mg L⁻¹). Também foram observados nessa área elevados níveis de outros metais, tais como: zinco, cobre, cádmio e chumbo (Tabela 2.1). A partir das amostras do *landfarming* foi isolado apenas uma bactéria que foi altamente tolerante à metilmercúrio (*P. putida* V1), essa cepa bacteriana apresentou o mais alto CIM dentre as cepas isoladas neste estudo (Tabela 2.2). Possivelmente esta contaminação pode exercer uma pressão sobre as bactérias presentes no local, forçando a adaptação de poucos microorganismos a um ambiente contaminado com vários metais. Uma explicação adicional para a alta resistência de *P. putida* V1 ao metilmercúrio é que este local apresentou uma alta concentração de matéria orgânica (>10%) em comparação com as demais áreas avaliadas (Tabela 2.1), o que pode resultar na formação de metilmercúrio por metilação abiótica devido à presença de ácidos húmicos e fúlvicos (Barkay et al., 2003).

O maior número de isolados obtidos no lodo do Sistema de Tratamento de Resíduos do Laboratório de Análises do Solo da UFRGS (Tabela 2.2) pode estar relacionado aos baixos níveis de mercúrio e outros metais encontrados quando comparadas com as outras áreas estudadas (Tabela 2.1). Tais condições aparentam ser muito menos adversas para a sobrevivência e crescimento das bactérias. Outra explicação seria o fato do laboratório analisar diferentes tipos de amostras de solo e lodo de esgoto proveniente de diferentes regiões e indústrias do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Neste lodo poderia existir um microambiente rico em diversidade microbiana, favorecendo a sobrevivência e crescimento das bactérias. O menor número de isolados bacterianos obtidos no presente estudo (n = 16) (Figura 2.1) em comparação com 204 isolados bacterianos encontrados por Nakamura et al. (1999) se deve provavelmente aos diferentes compostos de mercúrio que são utilizados nas etapas de enriquecimento e isolamento das bactérias. Enquanto que nesse estudo foi usado metilmercúrio para o isolamento de bactérias resistentes, em outros estudos é utilizado o cloreto de mercúrio, composto menos tóxico do que o metilmercúrio (Nakamura et al. 1988, Canstein et al., 1999, Fortunato et al. 2005, Tupe et al. 2007)

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) de metilmercúrio são apresentados na Tabela 2.2. Os valores de CIM para metilmercúrio foram diferentes entre as cepas bacterianas avaliadas. Observou-se que a maioria dos isolados testados (85,7%, n = 14) foi capaz de crescer na presença de metilmercúrio em concentrações superiores a 2,7 μM . A alta resistência ao metilmercúrio foi observada nos isolados V1, P1 (B), P1 (A) e P0,5, que foram capazes de crescer na presença de pelo menos 11,5, 9,6; 9,2 e 8,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ deste composto, respectivamente. Sendo que entre as cepas bacterianas avaliadas, *P. putida* V1 foi capaz de crescer na maior concentração metilmercúrio testada (11,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Ball et al. (2007) detectaram um nível maior de resistência ao metilmercúrio em bactérias isoladas de uma área de mineração de ouro na Venezuela. Estes autores observaram que a maioria dos isolados bacterianos (71%) foi capaz de crescer na presença de 13,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio.

Além da resistência ao metilmercúrio é desejável que as bactérias possuam tolerância ou resistência a vários outros metais que possam contaminar o ambiente. Para isso avaliou-se a tolerância ($\mu\text{mol L}^{-1}$) da cepa bacteriana *P. putida* V1 em meio LB e meio mínimo contendo diferentes concentrações de oito metais (Tabela 2.3). Observou-se que *P. putida* V1 apresentou elevada tolerância em meio LB ($\mu\text{mol L}^{-1}$) em relação ao cobre (1000), chumbo (1000), níquel (1000), cromo (1000), zinco (1000), cobalto (400), manganês (1000) e bário (1000). Contudo, quando utilizou-se um meio mínimo (MM) como substrato para os testes, a tolerância foi reduzida ($\mu\text{mol L}^{-1}$): cobre (400), níquel (100), cromo (100), zinco (400), cobalto (100), porém chumbo, manganês e bário apresentaram alta tolerância (1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 2.3). Quando o meio LB foi utilizado como substrato para o crescimento de *P. putida* V1, esta bactéria apresentou uma grande tolerância aos metais. Sob estas condições, *P. putida* V1 cresceu em meio contendo até 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a maioria dos metais testados, com exceção do cobalto (não apresentando crescimento acima de 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 1.3). Contudo, quando o meio MM foi utilizado, a tolerância desta cepa bacteriana foi reduzida, com exceção ao manganês, chumbo e bário. Tal fato ocorre porque MM fornece menos nutrientes para o crescimento microbiano, em

comparação com o meio LB, que simula melhor as condições restritivas encontradas no solo.

Tabela 2.3. Concentração inibitória mínima (CIM) de metais para *P. putida* V1.

Metal	CIM ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	Meio LB	Meio MM
Cobre	1000	400
Chumbo	1000	1000
Níquel	1000	100
Cromo	1000	100
Zinco	1000	400
Cobalto	400	100
Manganês	1000	1000
Bário	1000	1000

A Figura 2.2 mostra a capacidade de remoção de metilmercúrio do meio de cultivo (%) pelas cepas bacterianas tolerantes à metilmercúrio. Entre os isolados estudados, *P. putida* V1 induziu significativamente a remoção de metilmercúrio do meio LB ($p < 0,05$) (Figura 2.2). Esta bactéria foi capaz de remover aproximadamente 90% do metilmercúrio adicionado ao meio LB, enquanto que os isolados COMP.1.0, L1.0 e L1.7 não foram capazes de remover este composto do meio de cultivo. O isolado P1 (A) (*Serratia* sp.) removeu cerca de 50% de metilmercúrio do meio LB. Os outros isolados mostraram baixa capacidade de remoção de metilmercúrio do meio LB (2 a 20%), mas com altos valores de densidade óptica (Figura 2.2).

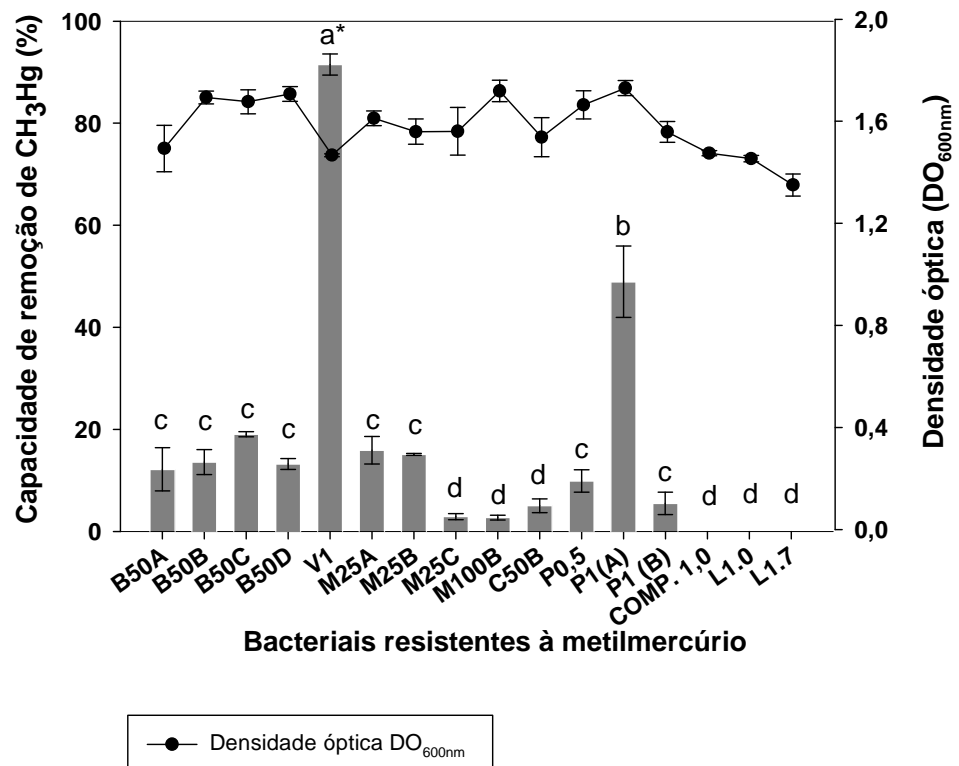


Figura 2.2. Capacidade de remoção de metilmercúrio do meio de cultivo (%) (barras verticais) e densidade óptica (linha) por cepas bacterianas tolerantes à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29°C na presença de 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Chien et al. (2010) verificaram em seus estudos que a maioria das bactérias isoladas foram capazes de remover de 90 a 50% dos compostos orgânicos adicionados ao meio de cultivo (cloreto de etilmercúrio, timerosal, benzoato de p-cloromercúrio, acetato de fenilmercúrio). Dentre os isolados avaliados por esses autores, uma cepa bacteriana do gênero *Pseudomonas* sp. apresentou resultados muito similares aos obtidos com *P. putida* V1 do presente estudo. *Pseudomonas* sp. K-62 foi capaz de remover 90% do metilmercúrio adicionado ao meio de cultivo, contudo quando se avaliou a volatilização PCMB (benzoato de p-cloromercúrio) essa cepa bacteriana apresentou a menor capacidade de remoção entre todos os isolados (35%). Esses resultados indicam assim a variabilidade entre as cepas pertencentes

ao mesmo gênero em relação à capacidade de remoção dos diferentes compostos de mercúrio. Sadhukhan et al. (1997) encontraram outros gêneros de bactérias resistentes ao metilmercúrio, que apresentavam alto potencial de remoção deste composto, tais como *E.coli*, *Sarcina* sp. e *Bacillus* sp. No entanto, esses autores observaram que apenas *Bacillus* sp. GT2 foi capaz de remover 81% do metilmercúrio adicionado ao meio de cultivo.

Alguns autores têm sugerido que há uma relação entre altos valores de CIMs e a elevada capacidade de remoção de metilmercúrio pelas cepas resistentes. Sadhukhan et al. (1997) relataram que *Bacillus* sp. GT2 apresentou o maior valor de CIM ($12,5 \text{ nmol L}^{-1}$) e maior potencial de volatilização (81%) entre os isolados bacterianos testados. No entanto, neste estudo essa relação entre o alto valor de CIM e elevada capacidade de remoção de metilmercúrio não foi observada, exceto para a *Pseudomonas* V1 e P1 (A). Já alguns isolados P1 (B), L1.0 e L1.7 apresentaram alto valor CIM ($9,6$ e $9,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), contudo não foram observados altos percentuais de remoção de metilmercúrio [P1 (B) (5,5%) e L1.0 e L1.7 (0%)]. Este resultado corrobora com os encontrados por Giovanella et al. (2011). Esses autores não encontraram uma relação entre a elevada CIM e a capacidade de remoção de mercúrio do meio de cultura. Uma possível explicação para resistência ao metilmercúrio e a ausência da remoção do mesmo, seja a presença de outros mecanismos de resistência, tais como: reações de adsorção (que podem ter ocorrido na membrana e no espaço periplasmático, troca iônica, redução de oxidação e precipitação, ou o metilmercúrio extracelular pode ter sido precipitado e complexado com produtos secretados pelas células (Camargo et al., 2007).

A capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 em diferentes concentrações de metilmercúrio ($\mu\text{mol L}^{-1}$) após 24 hs de incubação $29 \text{ }^\circ\text{C}$, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 2.3). A capacidade de remoção de metilmercúrio diminuiu significativamente quando testou-se a concentração inibitória mínima ($11,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Quando a concentração biocida ($12 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) foi testada, o crescimento de *P. putida* V1 foi limitado,

mas essa cepa bacteriana ainda foi capaz de remover 29% do metilmercúrio adicionado ao meio LB.

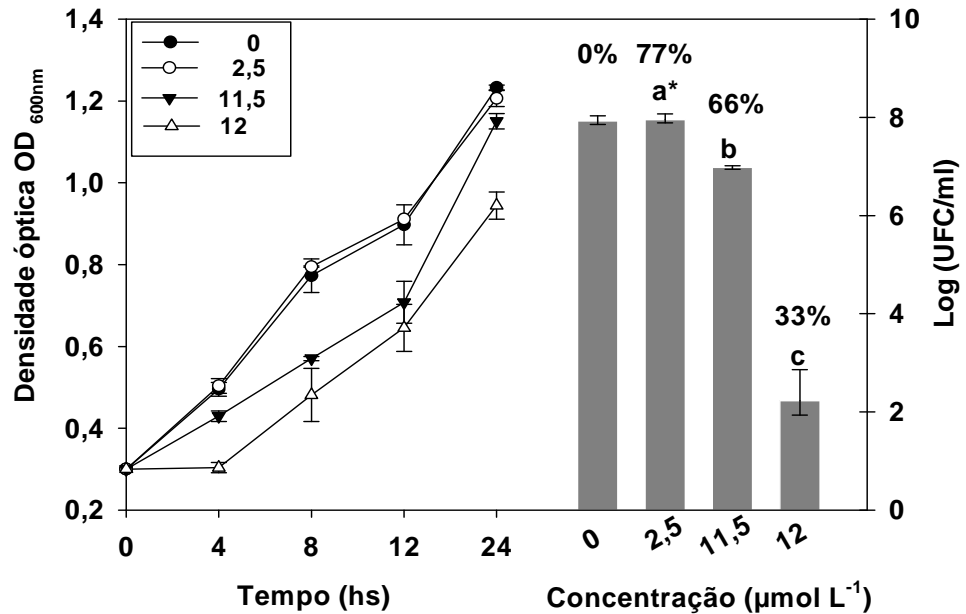


Figura 2.3. Perfil do crescimento em densidade óptica $DO_{600\text{ nm}}$ (linha) e Log (UFC/mL) (barras verticais) e capacidade de remoção de metilmercúrio do meio de cultivo (%) (números acima das barras verticais) por *P. putida* V1 em diferentes concentrações de metilmercúrio: 0, 2,5, 11,5, 12 ($\mu\text{mol L}^{-1}$) após 24 horas de incubação à 29°C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

A concentração biocida de metilmercúrio utilizada nesse estudo ($12 \mu\text{mol L}^{-1} = 2,2 \text{ mg kg}^{-1}$) está próxima das concentrações de mercúrio ($3,1 \text{ mg kg}^{-1}$) encontradas no local do isolamento dessa cepa bacteriana (Tabela 2.1). Apesar da elevada concentração, muito similar a concentração encontrada no ambiente, *P. putida* V1 ainda foi capaz de remover até 33% do metilmercúrio. Este fato reforça o potencial de *P. putida* V1 como um micro-organismo a ser utilizado em biorremediação de ambientes contaminados por mercúrio.

Giovanella et al. (2011) avaliaram a remoção de Hg por *Proteus mirabilis* M50C em baixa ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e em alta ($349 \mu\text{mol L}^{-1}$) concentração de HgCl_2 . Estes autores verificaram também uma redução significativa de remoção de Hg (25%) com o aumento da concentração de mercúrio no meio de cultivo. De acordo com Ghosh et al. (1997) altas concentrações de HgCl_2 afetaram a capacidade de remoção de mercúrio dos micro-organismos devido ao seqüestro intracelular de Hg por componentes celulares que se ligam ao metal. Embora Ghosh et al. (1997) e Giovanella et al. (2011) terem usado HgCl_2 para testar a capacidade de remoção dos isolados bacterianos, verificou-se um comportamento similar (redução da capacidade de remoção de mercúrio com o aumento na concentração de metilmercúrio) ao que foi observado no presente estudo utilizando metilmercúrio.

A Tabela 2.4 apresenta o pH final, densidade óptica e capacidade de remoção do metilmercúrio do meio de cultivo (%) por *P. putida* V1 após 24 horas de incubação à 29°C em diferentes pH. Como po de ser observado o pH aumentou após 24 horas de incubação, o que afetou a volatilização e crescimento de *P. putida* V1. A maior eficiência de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 foi observada em valores de pH inicial iguais a 4,0, 5,0 e 6,0 (80, 74 e 76%, respectivamente) ($p < 0,05$). Embora a eficiência de remoção tenha sido menor em comparação com incubações que apresentaram o meio mais ácido, quando o pH inicial foi de 7,0 e 8,0, a eficiência de remoção de metilmercúrio foi de cerca de 69 e 67%, respectivamente.

Nos extremos de pH (3,0 e 11,0) foram observados os mais baixos valores de remoção de metilmercúrio, isto é, 14% e 15%, respectivamente. O crescimento de *P. putida* V1 avaliado pela densidade óptica ($\lambda = 600 \text{ nm}$) após 24 horas, foi afetado pela variação de pH (Tabela 2.4). Os valores ótimos de pH para o crescimento celular de *P. putida* V1 em meio LB contendo metilmercúrio foram 4,0, 5,0 e 6,0 (>DO), mas também foi satisfatório em pH 7,0 e 8,0 ($p < 0,05$). A pH 11 houve uma queda acentuada no crescimento bacteriana (Tabela 2.4). Okino et al. (2000) avaliaram o efeito do pH na remoção de cloreto de mercúrio por *P. putida* PpY101/pSR134 e observaram que houve remoção de mercúrio em pH 6,0 e 7,0, mas não em

pH 4,0. Já em estudos realizados por Zhang et al. (2011) esses autores observaram a eficiência de remoção de mercúrio em um pH de 8,0 e 9,0.

Tabela 2.4. pH final, densidade óptica e capacidade de remoção do metilmercúrio do meio de cultivo (%) por *P. putida* V1 após 24 horas de incubação à 29°C em diferentes pH. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Faixa de pH	pH Final	Densidade óptica DO ₆₀₀ (%)	Capacidade de remoção do metilmercúrio (%) ^a
3.0	5,5 ± 0.03	1,16 ± 0,079 c	14,74 ± 2.68 d
4.0	7,8 ± 0.04	1,59 ± 0,038 a	78,16 ± 3.45 a
5.0	7,9 ± 0.023	1,58 ± 0,035 a	76,43 ± 2.63 a
6.0	7,8 ± 0.02	1,52 ± 0,027 a	76,01 ± 2.68 a
7.0	7,8 ± 0.04	1,49 ± 0,003 b	69,14 ± 2.38 b
8.0	8,1 ± 0.07	1,46 ± 0,027 b	67,48 ± 1.94 b
9.0	8,5 ± 0.03	1,38 ± 0,020 c	51,30 ± 0.00 c
11.0	9,3 ± 0.09	0,16 ± 0,002 d	15,71 ± 3.40 d

^a Porcentagem de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 é expressa pela concentração inicial de metilmercúrio que foi adicionada ao meio de cultivo com diferentes pH subtraindo o mercúrio remanescente.

O pH tem efeito na carga elétrica de enzimas e, conseqüentemente, na conformação da proteína e sua função enzimática (Farrell e Ranallo 2000). Sabe-se que o pH influencia fatores relacionados com a atividade microbiana no solo, tais como a solubilidade e ionização de constituintes orgânicos na solução do solo, e estes fatores têm ação na atividade enzimática de micro-organismos e em sua capacidade degradadora (Voroney, 2007). Portanto a capacidade de *P. putida* V1 em crescer em uma ampla faixa de pH pode ser útil para estabelecer estratégias de remoção de metilmercúrio de ambientes contaminados.

O efeito da temperatura na remoção de metilmercúrio e crescimento de *P. putida* V1 foi avaliado entre 10 e 40°C por 24 h (Figura 2.4). A maior eficiência de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 foi observada entre 21-25°C (80%) ($p < 0,05$) (Figura 2.4). A remoção nas faixas de temperaturas entre 10-20, 26-30 e 31-35°C não foi significativamente diferente ($p > 0,05$). Apesar disto, a capacidade de remoção pode ainda ser considerada elevada uma vez que atingiu valores iguais a 73%, 75% e 71% de remoção do metilmercúrio em temperaturas entre 10-20, 26-30 e 31-35°C, respectivamente. A menor remoção de metilmercúrio (média de 63%) por *P. putida* V1 foi observada entre 36 e 40°C.

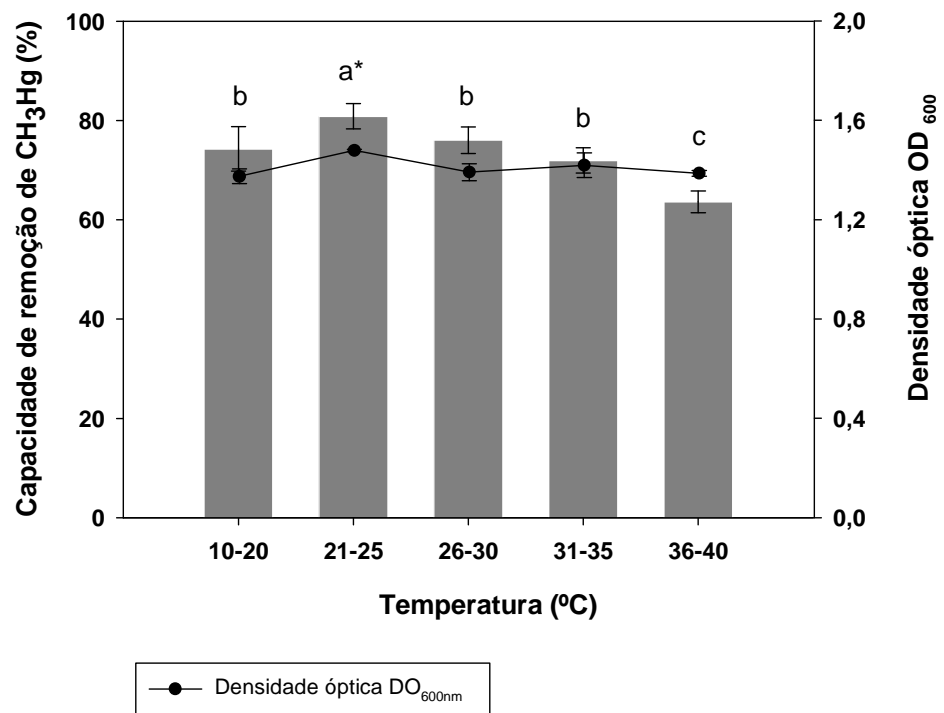


Figura 2.4. Capacidade de remoção de metilmercúrio do meio de cultivo (%) por *P. putida* V1 (barras verticais) e crescimento (linha) após 24 horas em diferentes temperaturas (°C) na presença de 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Apesar da temperatura ter influenciado na remoção de metilmercúrio, não houve diferença no crescimento (DO_{600}) na faixa de temperatura testada (Figura 2.4). Resultados similares foram obtidos por

Okino et al. (2000), observaram as taxas de remoção de cloreto de mercúrio por *P. putida* PpY101/pSR134 em temperaturas iguais a 15, 20, 30 e 37°C. Os resultados desses experimentos do efeito da temperatura sobre o crescimento e remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 indicaram que esta bactéria é capaz de remover grandes quantidades de metilmercúrio em uma ampla faixa de temperatura.

3.4 CONCLUSÕES

O isolamento de bactérias de ambientes contaminados com mercúrio foi eficiente. A melhor cepa bacteriana (*P. putida* V1) apresentou alta capacidade de remoção de metilmercúrio do meio líquido. O crescimento e a capacidade de *P. putida* V1 em remover metilmercúrio ocorre em uma ampla faixa de pH (4,0 e 8,0) e de temperatura (10-35°C). Essa cepa bacteriana também apresentou alta tolerância a outros metais pesados, como: chumbo, manganês e bário em meio mínimo e capacidade em crescer na presença de até 11,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 215, p.403–410, 1990.

BALL, M. M.; CARRERO, P.; CASTRO, P. C. Mercury resistance strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). **Current Microbiology**, New York, v.54, n.2, p.149–154, 2007.

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

BARKAY, T.; SCHAEFER, J. Metal and radionuclide bioremediation: Issues, considerations and potentials. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam v.4, n.3, p.318-323, 2001.

BHATTACHARYA, J.; ISLAM, M.; CHEONG, Y. Microbial growth and action: Implications for passive bioremediation of acid mine drainage. **Mine Water and the Environment**, New York, v.25, n.4, p.233-240, 2006.

BISINOTI, M. C. F.; JARDIM, W. F. Behavior of methylmercuric in the environment. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.4, p.593-600, 2004.

BON, E. P. S. et al. Bioprocessos para produção de enzimas. In: ENZIMAS em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ:CAPES: FAPERJ: FCT, 2008. p. 95–123.

CAMARGO, F. A. O. et al. Uso de microrganismos para remediação de metais. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, 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 Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.5279-5284, 1999.

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). **Variáveis de Qualidade das Águas**. 2006. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

CHADHAIN, S.M. N. et al. Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v.8, n.10, p.1746-1742, 2006.

CHATZIEFTHIMOU, A. et al. T. The isolation and initial characterization of mercury resistant chemolithotropic thermophilic bacteria from mercury rich geothermal springs. **Extremophiles**, New York, v.11, n.3, p.469-479, 2007.

CHIEN, M. F. et al. Organomercurials removal by heterogeneous *merB* harboring bacterial strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v.110, n.1, p.94-98, 2010.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds **Critical Reviews in Toxicology**, New York, v.36, n.8, p.609–662, 2006.

COMPEAU, G. C.; BARTHA, R. Sulfate-reducing bacteria: principle methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, n.2, p. 498-502, 1985.

DETKOVA, E. N.; BOLTYANSKAYA, YU V. Osmoadaptation of haloalkaliphilic bacteria: role of osmoregulators and their possible practical application. **Microbiology**, New York, v.76, n.5, p.511–522, 2007.

DOUSKOVA, I. et al. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.82, n.1, p.179–185, 2009.

FARRELL, S.O.; RANALLO, R. T. **Experiments in biochemistry: a hands-on approach**. Philadelphia: Saunders, 2005. 400p.

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOMETRIA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE

BIOMETRIA, 45, 2000. São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.235.

FORTUNATO, R.; CRESPO, J.G.; REIS, M. A. M. Biodegradation of thiomersal containing effluents by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. **Water Research**, Amsterdam, v.39, n.15, p.3511-3522, 2005.

GALTIER, N.; GOUY, M.; GAUTIER, C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. **Computer Applications in the Biosciences**, Oxford, v.12, n.6, p. 543–554, 1996.

GADD, G. M. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. **Geoderma**, Amsterdam, v.122, n.2-4, p.109-119, 2004.

GHOSH, S. et al. Elimination of Mercury and Organomercurials by Nitrogen-Fixing Bacteria. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.58, n.6, p.993-998, 1997.

GILMOUR, C.C.; HENRY, E.A.; MITCHELL, R. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.26, n.11, p.2281-2287, 1992.

GIOVANELLA, P. et al. Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. **Química Nova**, São Paulo, v.34, n.2, p.232-236, 2011.

GREEN-RUIZ, C. Mercury(II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary **Bioresource Technology**, Amsterdam v.97, n.15, p.1907–1911, 2006.

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**, Washington, v. 28, n.3, p.413-418, 1985.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v.25, n.1, p.1-24, 1995.

HENRIETTE, C.; PETITDEMANGE, E.; RAVAL, G. 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**, London, v.71, n.5, p.439-444, 1991.

HOLT, J.G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9^o ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p.

INDIRAGANDHI, P. et al. Cultivable bacteria associated with larval gut of prothiofos-resistant, prothiofos-susceptible and field-caught populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* and their potential for, antagonism towards entomopathogenic fungi and host. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v.103, n.6, p.2664-2675, 2007.

JACKSON, V. A. et al. Bioremediation of metal contamination in the Plankenburg River, Western Cape, South Africa. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v.63, n.5, p.559–568, 2009.

JAN, A. T. et al. Mercury pollution: an emerging problem and potential bacterial remediation strategies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v.33, n.8, p. 631-645, 2009.

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**. Washington, v. 367, n.1, p. 341-353, 2006.

KHAN, S.T. et al. Members of the Comamonadaceae as primary poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in active sludge as revealed by a polyphasic approach. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.7, p.3206-3214, 2002.

KAPLEY, A.; PUROHIT, H. J. Genomic tools in bioremediation. **Indian Journal Microbiology**, New York, v.49, n.2, p.108-113, 2009.

KYIONO, M., PAN-HOU, H. Genetic engineering of Bacteria for environmental remediation of mercury. **Journal of Health Science**, Tokyo, v.52, n.3, p.199-204, 2006.

LANG, E. et al. Characterization of *Pseudomonas azelaica* DSM 9128, leading to emended description of *Pseudomonas citronellolis*. **International Journal of**

Systematic and Evolutionary Microbiology, Spencers Wood , v.57, n.4, p.878-882, 2007.

LEONG, C. C.; SYED, N. I.; LORSCHIEDER, F.L. Retrograde degeneration of neurite membrane structural integrity of nerve growth cones following in vitro exposure to mercury. **NeuroReport**, London, v.12, n.4, p.733– 737, 2001.

MELAMED, R.; VILLAS BÖAS, 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, , 2002. p.48. (Série Tecnologia Ambiental)

MILES, A. A.; MISRA, S.S.; IRWIN, J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood **The Journal of Hygiene**, London, v.38, n.1, p.732-749, 1938.

MODOI, C. O.; OZUNU, A. L.; STEZAR, I.C. Risks Associated to Soil Pollution in the Proximity of Tailing Facilities in the Western Area of Baia Mare. **Proenvironment Promediu**, Napoca, v.3, n.6, p.352-35, 2010.

MURTAZA, I.; DUTT, A.; ALI, A. Relationship between the persistence of mer operon sequences in *Escherichia coli* and their resistance to mercury. **Current Microbiology**, New York, v.44, n.3, p.178-183, 2002.

NAKAMURA, K. et al. Removal of mercury from mercury-contaminated sediments using a combined method of chemical leaching and volatilization of mercury by bacteria. **Biodegradation**, New York, v.10, n.6, p.443–447, 1999.

NAKAMURA, K.; FUJISAKI, T.; YOSHISADA, S. Mercury-Resistant bacteria in sediment of Minamata Bay [Japan]. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**. Tokyo, v.54, n.8, p.1359-1363, 1988.

NAM, D.; BASU, N. Rapid methos to detect organic mercury and total selenium in biological samples. **Chemistry Central Journal**, London v.5, n.3, p.1-5, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Toxicological Effects of Methylmercury**. Washington, DC, National Academy Press, 2000.

NARITA, M. et al. Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.223, n.1, p. 73-82, 2003.

NIES, D.H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v.51, n.6, p.730–750, 1999.

NCBI.**GenBank/Overview**.Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>Acesso em: 27/01/2012.

OLSON, B. H. et al. Toxic element contamination and the occurrence of mercury-resistant bacteria in Hg-Contaminated soil, sediments, and sludges **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.20, n.2, p. 226-233, 1991.

OKINO, S. et al. Development of a biological mercury removal-recovery system. **Biotechnology Letters**, New York, v.22, n.9, p.783-788, 2000.

PÁEZ-ESPINO, D. et al. Microbial responses to environmental arsenic. **Biometals**, New York, v.22, n.1, p.117-130, 2009.

PONCE, R. A. et al. Effects of methylmercury on the cell cycle of primary rat CNS in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam, v.127, n.1, p.83–90, 1994.

SADHUKHAN, P.C. et al. Mercury and organomercurial resistance in bacteria isolated from freshwater fish of wetland fisheries around Calcutta. **Environmental Pollution**, Amsterdam v.97, n.1-2,p. 71 -78, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.V. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SAR, P.; D'SOUZA, S.F. Biosorptive uranium uptake by a pseudomonas strain: Characterization and equilibrium studies. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, Hoboken, v.76, n.12, p.1286-1294, 2001.

SINGH, A.; WARD, O. Biotecnology and bioremediation – an overview In: SINGH, A., WARD, O. (Ed). **Biodegradation and Bioremediation**. New York, Springer, 2004. 309p.

SILVER, S.; PHUNG, L.T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.50, p.753-789, 1996.

SILVER, S.; PHUNG, T. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.32, n.11-12, p.587–605, 2005.

SMITH, T. et al. Bacterial oxidation of mercury metal vapor, Hg (0). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v, 64, n.4, p.1328-1332, 1998.

STANDING, D.; KILHAM, K. The soil environment, In: MODERN soil microbiology. Boca Raton FL: CRCpress, 2007, p. 1-227.

SUMMERS, A.O.; SILVER, S. Microbial transformation of metals. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto ,v.32, p.637-672, 1978.

SYVERSEN, T.L. Effects of repeated dosing of methyl mercury on in vivo protein synthesis in isolated neurones. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, Conpenhagen, v.50, p.391-397, 1982.

SKYLLBERG, U. et al. Elevated Concentrations of Methyl Mercury in Streams after Forest Clear-Cut: A Consequence of Mobilization from Soil or New Methylation? **Environmental Science and Technology**, Washington v.43, n.2, p.8535-8541, 2009.

TAKEBAYASHI, S.; NARIHIROT, FUJII, Y.; HIRAIISHI, A. Water Availability Is a Critical Determinant of a Population Shift from Proteobacteria to Actinobacteria during Start-Up Operation of Mesophilic Fed-Batch Composting. **Microbes and Environments**, Kashiwa Chiba, v.22, n.3, p.279-289, 2007.

TAKEUCHI, F. et al. Existence of an iron-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* resistant to organomercurial compounds. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Amsterdam, v.99, n.6,p.586-591, 2005.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S.; WONG, M.H. Novel technology in pollutant removal at source and bioremediation **Ocean and Coastal Management**, Amsterdam, v.52,n.7, p. 368-373, 2009.

TAZISONG, I.; SENWO, Z. Mercury Concentration and Distribution in Soils Impacted by Long-Term Applied Broiler Litter **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.83, n.2, p.291-294, 2009.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TUPE, S.G.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M. Taguchi approach significantly increases bioremediation process efficiency: a case study with Hg (II) removal by *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, Hoboken, v.45, n.1, p.36–41, 2007.

UCHINO, M. et al. Recharacterization of *Pseudomonas fulva* Iizuka and Komagata 1963, and proposals of *Pseudomonas parafulva* sp. nov. and *Pseudomonas cremoricolorata* sp. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v.47, n.5, p.247-261, 2001.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **SW-846, Method 7471B, Mercury in Solid or Semisolid Waste** (Manual Cold Vapor Technique). Washington, DC, 2007.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; SÁ, M.H.B. **Bacteriologia geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 604p.

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

VORONEY, R.P. Soil Habitat. In: PAUL, E.A. (Ed.) **Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry**. 3th.ed. Burlington: Academic Press, 2007. Chapter 2, p.1.515

WAGNER-DÖBLER, I. Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Secaucus, N.J., v.62, n.2-3, p.124-133, 2003.

WEBER, J.H. Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment. **Chemosphere**, Amsterdam, v.26, n.11, p.2063-2077, 1993.

WHITELEY, C.G.; LEE, D.J. Enzyme technology and biological remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v.38, n.3-4, p.291-316, 2006.

ZHANG, W.; CHEN, L.; LIU, D. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Secaucus, N.J., v.93, n.3, p.1305-14, 2011

CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DE CONDIÇÕES DE ESTRESSE NA REMOÇÃO *in vitro* DE METILMERCÚRIO POR *Pseudomonas putida* V1

4.1 INTRODUÇÃO

O enriquecimento por nutrientes e sais e a presença de metais pesados podem interferir na atividade da microbiota presente nos ecossistemas. Tais contaminações representam grandes problemas ambientais em diversas partes do mundo. Enquanto o enriquecimento por nutrientes é descrito como a principal causa da eutrofização (degradação de corpos e reservatórios d'água provocando um aumento excessivo de algas que limitam a atividade biológica), o enriquecimento por sais pode resultar, por exemplo, no caso de solos, em grandes fenômenos de degradação, tais como dispersão, perda da estrutura, redução da produtividade agrícola, além de afetar a atividade dos micro-organismos do solo (FAO, 1988; Metternicht e Zinck, 2003; Mavi et al., 2012,).

Fertilizantes são fontes de nutrientes utilizados para o crescimento de plantas, contudo aplicações excessivas podem conduzir a poluição não somente do solo mas também da água (Bustamante et al., 2011; Kros et al., 2011; Ray et al., 2001). Dentre os principais sais utilizados na agricultura encontram-se: fosfato, nitrato, sulfato e molibdato. A presença de fosfato e nitrato é frequentemente associada a problemas ambientais em lagos e córregos, pois ocasionam eutrofização das águas (Zhang et al., 2003). O sulfato e o molibdato podem ser solúveis em solos em condições normais ou em solos inundados, podendo também percolar para os corpos d'água (Bustamante et al., 2011; Kaiser et al., 2005).

A contaminação dos solos e das águas por metais pesados constitui outro grande desafio ambiental, que pode ser agravada pela aplicação de fertilizantes, lodo de esgoto, resíduos industriais e animais constituem as principais fontes de elementos traços (Bertol et al., 2010; Li et al., 2008; Pires, 2006). Os metais pesados apresentam toxicidade que pode levar a degradação e perda de diversidade biológica dos ecossistemas, particularmente devido a efeitos deletérios aos micro-organismos, plantas, animais e ao homem. Na maioria dos casos, a contaminação do solo por metais está associada a mais de um elemento (Klauberg Filho et al., 2005). Todavia, as interações entre os metais contaminantes e os micro-organismos são freqüentes e intensas no solo (McBride, 1994).

Além dos nutrientes e dos metais, a avaliação das concentrações de sais em corpos d'água é muito importante porque alguns metais podem ser metilados nesses ambientes, como no caso do mercúrio. A formação de metilmercúrio constitui uma grande preocupação ambiental e ocorre quando o mercúrio atinge o ambiente, principalmente os sistemas aquáticos e reage com sulfato e há a formação de um precipitado insolúvel e metilação por micro-organismos (Barkay et al., 2003). A metilação do mercúrio por micro-organismos pode ocorrer tanto na água como em sedimentos e uma vez formado, o metilmercúrio é facilmente biomagnificado na cadeia alimentar (Choi e Bartha, 1993; Jensen e Jernelöv, 1969; King et al., 2000). Sabendo-se que a atividade microbiana desempenha um papel crítico na modulação da toxicidade do mercúrio no ambiente, esta pode ser afetada por diversos componentes e contaminantes do ambiente.

Com base no exposto acima, o estudo da influência da presença de nutrientes (nitrato, fosfato, sulfato e molibdato), presença de metais pesados (chumbo, cobre, cromo e níquel) e de sais (NaCl) *in vitro* constituem etapa primordial na investigação do potencial de bactérias resistentes para o uso em processos de biorremediação. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a influência de diferentes concentrações de nutrientes, metais pesados e NaCl sobre a capacidade de o crescimento celular e de remoção de metilmercúrio de *P. putida* V1 em condições *in vitro*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Um isolado de *Pseudomonas* (*P. putida* V1) resistente a metilmercúrio, obtido em amostra de solo proveniente do *Landfarming* do pólo petroquímico de Triunfo, RS, foi utilizada neste estudo (Cabral et al., 2012). O pré-inóculo foi preparado a partir de uma alçada de *P. putida* V1 inoculada em meio Luria Bertani (LB) contendo $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio (CH_3Hg), seguindo-se incubação por 24 h à $29 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 100 rpm. Após 24 horas foi retirada uma alíquota e esta foi adicionada ao meio de cultura LB de modo se obter uma leitura de 0,300 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$, que correspondia a aproximadamente 10^7 UFC/mL.

O efeito da presença de molibdato (MoO_4^{2-} - $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), fostato (PO_4^{3-} - K_2HPO_4), nitrato (NO_3^- - KNO_3), e sulfato (SO_4^{2-} - K_2SO_4), no crescimento celular e na capacidade de remoção do metilmercúrio por *P. putida* V1 foi determinado utilizando-se o meio LB com as seguintes concentrações de cada sal: 50, 100, 200 e 300 mmol L^{-1} . Estas concentrações foram baseadas em estudos de inibição celular utilizando molibdato e nitrato em concentrações variando entre 5 à 75 mmol L^{-1} conduzidos por Rincón et al. (2008). Contudo, foi observado que *P. putida* V1 podia crescer em meio de cultura contendo nesta faixa de concentração (5 à 75 mmol L^{-1}), houve então um incremento nas concentrações utilizadas no presente estudo. Além disso, também avaliou-se a capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 em mistura dos sais (molibdato, fostato, nitrato e sulfato), nas

concentrações 1, 1/2 e 1/3 da concentração máxima (300 mmol L⁻¹). Estas concentrações foram baseadas nos experimentos conduzidos com cada sal previamente e levando-se em conta a possibilidade de que a dose inteira da mistura dos sais (molibdato, fosfato, nitrato e sulfato) totalizando 300 mmol L⁻¹ fosse tóxica.

O efeito do teor de NaCl no crescimento celular e na capacidade de remoção do metilmercúrio pela *P. putida* V1 foi avaliada usando LB adicionados de concentrações variadas de NaCl (0.5%, 1%, 3%, 5%, 10%, e 20%). Estas concentrações foram escolhidas baseadas em Nakamura et al. (1999). Todavia, devido à capacidade da *P. putida* V1 de crescer em meio de cultura contendo até 15% NaCl, concentrações mais elevadas foram utilizadas. O crescimento da *P. putida* V1 foi avaliado por meio de leitura da densidade óptica (OD_{600 nm}) e o mercúrio remanescente foi determinado conforme descrito no EPA 7471B.

Para determinação do crescimento de *P. putida* V1 na presença dos metais: cobre (CuCl₂ × 2H₂O), níquel (NiCl₂ × 6H₂O), cromo (CrK₂O₄) e chumbo (Pb[C₂H₃O₃]₂ × 3H₂O), o pré-inóculo foi preparado a partir de uma alçada de *P. putida* V1 inoculada em meio Luria Bertani (LB) contendo 2,3 μmol L⁻¹ de metilmercúrio (CH₃Hg), seguindo-se incubação por 24 h à 29 °C sob agitação de 100 rpm. Após 24 horas foi retirada alíquota e esta foi adicionada ao meio de cultura LB de modo se obter uma leitura de 0,300 unidades DO_{600nm}, que correspondia a aproximadamente 10⁷ UFC/mL. Posteriormente, adicionaram-se as soluções de cada metal estudado em variadas concentrações: 100, 300, 600 μmol L⁻¹ em 5 mL de caldo LB inoculado, seguindo-se incubação por 48 h à 29 °C. Tais concentrações foram escolhidas baseadas nos resultados prévios (capítulo 2) que indicaram que *P. putida* V1 possuía uma CIM de 1,000 μmol L⁻¹ para os metais avaliados em caldo LB. Assim, como objetivou-se avaliar o crescimento celular de *P. putida* V1 em LB com e sem metilmercúrio, uma concentração maior que 600 μmol L⁻¹ seria muito tóxica e acarretaria a morte da bactéria, principalmente quando metilmercúrio foi adicionado ao meio de cultura. Para avaliar a influência combinada dos metais (cobre, chumbo, níquel e cromo) e metilmercúrio sobre

o crescimento celular de *P. putida* V1, ao meio LB foi adicionado metilmercúrio a uma concentração de $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os tubos contendo caldo LB inoculados com *P. putida* V1, e que continham ou não metilmercúrio e diferentes metais foram incubados à $29 \text{ }^\circ\text{C}$ e o crescimento celular foi mensurada pela densidade óptica ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$) em diferentes intervalos de tempo: 0, 4, 8, 12, 24 e 48 hs. O meio LB sem metais e sem metilmercúrio, mas inoculado com *P. putida* V1, foi utilizado como controle positivo do experimento. Já diferentes tubos contendo metais e metilmercúrio, sem inóculo, constituíram o controle negativo.

A capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 de caldo LB contendo ou não metilmercúrio e os metais cobre ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), níquel ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), cromo (CrK_2O_4) e chumbo ($\text{Pb}[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_3]_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$) foi avaliada seguindo-se o protocolo descrito anteriormente. Todavia, a concentração de metilmercúrio adicionada ao caldo LB foi de $0.008 \mu\text{mol L}^{-1}$, pois experimentos prévios (dados não apresentados) indicaram que com a concentração de $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ havia morte da *P. putida* V1. Já no caso dos metais, as concentrações estudadas foram de 100 e $600 \mu\text{mol L}^{-1}$. Tubos contendo os metais e metilmercúrio, sem inóculo, constituíram o controle negativo. As amostras foram digeridas e as leituras da quantidade de mercúrio remanescente foram feitas conforme descrito no item a seguir.

Para as análises de mercúrio remanescente, os frascos foram previamente limpos com ácido nítrico (30%) e enxaguados com água destilada. Após 24 horas de incubação, os erlenmeyers foram colocados em capela de exaustão de gases para a retirada do Hg volátil, onde permaneceram por 10 minutos. Antes da análise de mercúrio por vapor a frio, as amostras foram digeridas pelos métodos EPA 7471B e 245.1 EPA. Após o período em capela de exaustão, agitou-se fortemente os frascos e retirou-se uma alíquota de suspensão celular e sobrenadante ($100 \mu\text{L}$) e adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico e 2 mL ácido nítrico concentrado (HNO_3). Em todas as amostras, foram adicionados 10 mL de permanganato de potássio (KMnO_4), seguindo-se aquecimento das amostras em autoclave por 15 minutos a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ e pressão de 1,5 atm. O permanganato de potássio remanescente foi

reduzido com 6 mL de 10% hidroxilamida (CINH_2OH_2). As análises do mercúrio remanescente foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica/vapor frio (Perkin Elmer - Analyst 100).

Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias e desvio padrão ($N-1$) foram calculados. Os resultados foram submetidos ao teste de média Tukey ($p < 0.05$) usando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da avaliação da influência do molibdato, fosfato, nitrato e sulfato sobre o crescimento celular e capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 após 24 horas de incubação a 29 °C podem ser observados nas Figuras 3.1 (A-D). O mais alto percentual de remoção de metilmercúrio foi observado no tratamento controle (85%). Pode-se observar que houve um declínio significativo da capacidade de remoção de metilmercúrio do caldo LB, nas concentrações estudadas de todos os nutrientes (MoO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- , SO_4^{2-}) quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Apesar da presença de molibdato, fosfato, nitrato e sulfato nas concentrações testadas terem afetado a capacidade de remoção do metilmercúrio por *P. putida* V1, o crescimento desta bactéria foi afetado somente em algumas condições [Figura 3.1 (A-D)]. As baixas concentrações de molibdato (50 e 100 mmol L^{-1}) afetaram em menor intensidade o crescimento de *P. putida* V1, enquanto que as altas concentrações (200 e 300 mmol L^{-1}) afetaram em maior intensidade (Figura 3.1A). Nas menores concentrações de fosfato (50, 100 mmol L^{-1}) o crescimento de *P. putida* V1 foi pouco afetada (1,4 e 1,3 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$, respectivamente), porém quando inoculada em meio de cultura com concentrações mais elevadas deste sal (200 e 300 mmol L^{-1}), o crescimento de *P. putida* V1 foi reduzido (0,9 e 0,8 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$, respectivamente) (Figura 3.1B).

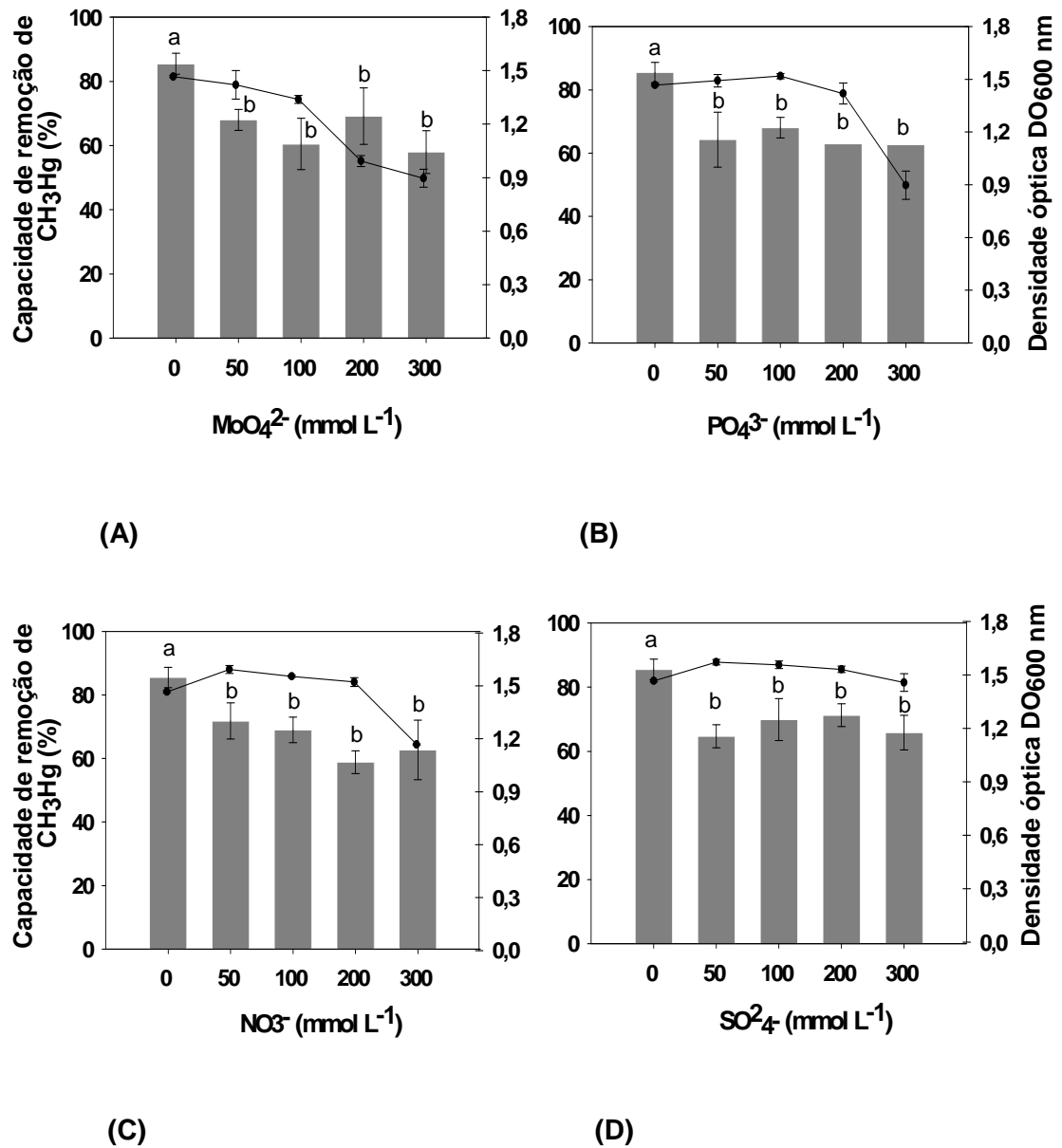


Figura 3.1. Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) e densidade óptica em diferentes concentrações de (A) Molibdato (MoO_4^{2-}), (B) Fosfato (PO_4^{3-}), (C) Nitrato (NO_3^-), (D) Sulfato (SO_4^{2-}) por *P. putida* V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Em relação ao nitrato, observou-se um aumento no crescimento de *P. putida* V1 nas menores concentrações testadas (50, 100 mmol L⁻¹), sendo que o aumento da absorvância foi maior do que o observado no controle (1,5 unidades DO_{600nm}, respectivamente) (Figura 3.1C). A concentração de 300 mmol L⁻¹ de nitrato afetou ligeiramente o crescimento de *P. putida* V1 (1,1 unidades DO_{600nm}) e conseqüentemente provocou uma pequena redução na capacidade de remoção de metilmercúrio pela *P. putida* V1 (13%). Quando sulfato foi avaliado, o crescimento de *P. putida* V1 praticamente não foi afetada, inclusive verificando-se um pequeno incremento médio na densidade óptica de 1,5 unidades DO_{600nm} (Figura 3.1D). Apesar disto, este aumento não refletiu em uma maior capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 na presença de sulfato.

Além de avaliar o efeito dos diferentes sais (MoO₄²⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻) individualmente sobre o crescimento e capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1, também foi testado o uso em conjunto destes sais (Figura 3.2). Foi avaliado a influência das misturas em concentrações iguais a 1 dose (1200 mmol L⁻¹), ½ dose (600 mmol L⁻¹) e 1/3 dose (400 mmol L⁻¹) da concentração máxima (300 mmol L⁻¹) de cada composto. A mistura dos compostos nas concentrações testadas reduziu significativamente a capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 ($p < 0,05$) (Figura 3.2). Um declínio na capacidade de remoção de metilmercúrio (52%) por *P. putida* V1 foi verificado quando utilizou-se a mistura dos compostos na concentração máxima (300 mmol L⁻¹).

Além de afetar a capacidade de remoção de metilmercúrio, a mistura de MoO₄²⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻ também afetou o crescimento de *P. putida* V1 em meio de cultura contendo a concentração máxima (300 mmol L⁻¹) (Figura 5). Um percentual de remoção de metilmercúrio de 52% pode ser considerado alto quando comparado a pequena variação da absorvância. Nas misturas dos compostos em 1/2 e 1/3 da concentração máxima (300 mmol L⁻¹), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1, que variou entre 70 e 76%, respectivamente. Por outro lado, a capacidade de remoção do metilmercúrio em meio de cultura

contendo 1/3 da concentração máxima dos compostos (300 mmol L^{-1}), ou seja, 100 mmol L^{-1} , foi maior do que quando os compostos foram testados isoladamente. No que concerne ao crescimento celular de *P. putida* V1, verificou-se que ela foi afetada quando utilizou-se os compostos em mistura, sendo que nas concentrações iguais a 1 e 1/2 da concentração máxima (300 mmol L^{-1}) observaram-se os mais baixos valores de absorbância. Quando concentrações de 1/3 da concentração máxima (300 mmol L^{-1}) foram avaliadas, detectou-se o valor mais alto de absorbância.

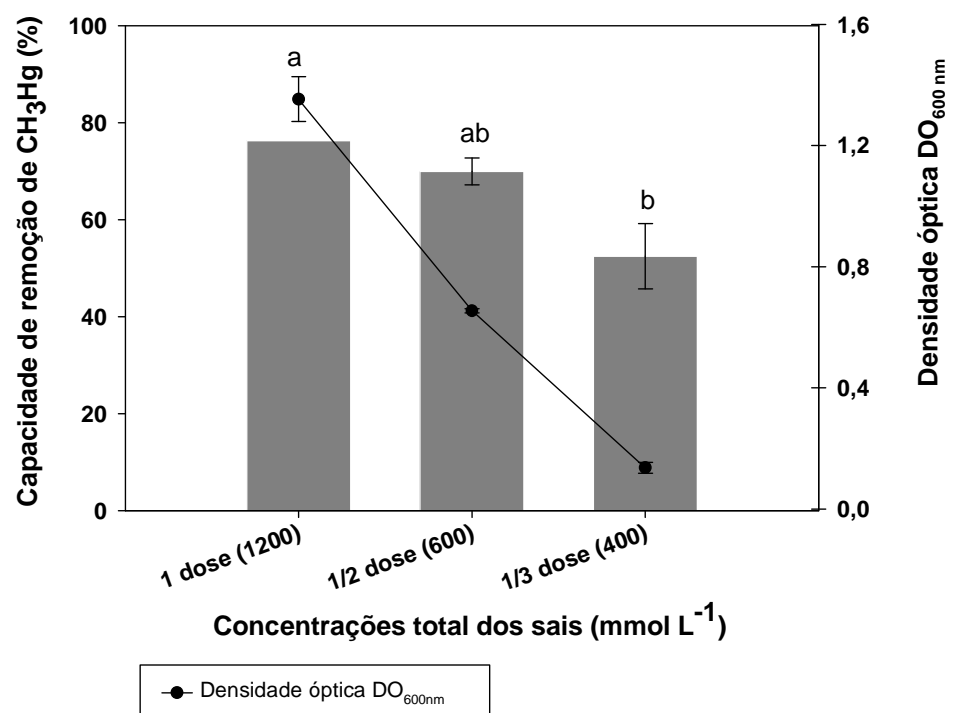


Figura 3.2. Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) e densidade óptica em mistura dos compostos MoO_4^{2-} ; PO_4^{3-} ; NO_3^- ; $\text{K}_2\text{SO}_4^{2-}$, nas concentrações 1 (1200 mmol L^{-1}), $\frac{1}{2}$ (600 mmol L^{-1}) e $\frac{1}{3}$ (400 mmol L^{-1}) da concentração máxima (300 mmol L^{-1}) por *P. putida* V1 tolerante à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29°C . Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Apesar da capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. Putida* V1 ter sido afetada negativamente pela adição de sais (MoO_4^{2-} , PO_4^{3-} , NO_3^- , SO_4^{2-}) no caldo LB quando comparado ao controle (0), contudo a mesma não

foi afetada pela variação das concentrações dos sais testados (50-300 mmol L⁻¹). Já o crescimento de *P. Putida* V1 aumentou com o aumento na concentração de determinados sais (nitrato, fosfato e sulfato) e diminuiu quando as concentrações de molibdato foram aumentadas. O molibdato foi o sal que mais afetou o crescimento pois o mesmo é requerido em menor quantidade para promover o crescimento da bactéria. A capacidade de remoção de metilmercúrio foi pouco afetada pelo aumento na concentração dos sais testados (MoO₄²⁻, PO₄³⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻) e se manteve estável. Estes resultados são positivos do ponto de vista da potencial aplicação desta bactéria em processos de biorremediação, já que tais características permitem que *P. putida* V1 possa ser utilizada para transformação de contaminantes em ambientes contaminados que apresentam excesso de sais de origem urbana ou agrícola.

A capacidade de remoção de metilmercúrio foi estatisticamente significativa entre as diferentes concentrações de NaCl (%) após 24 hs de incubação 29 °C (p < 0,05) (Figura 3.3). As maiores capacidades de remoção de metilmercúrio pela *P. putida* V1 foram observadas entre as concentrações: 3, 5 e 10% de NaCl. As menores capacidades de remoção de metilmercúrio foram observadas entre as concentrações 10 e 20% (20 e 13% de remoção, respectivamente). O crescimento celular da *P. putida* V1 foi diferente entre as concentrações de NaCl, sendo que maiores valores de absorbância foram obtidos nas concentrações 0,5, 1, 3 e 5% de NaCl, verificando-se um menor crescimento nas concentrações de 10 e 20%.

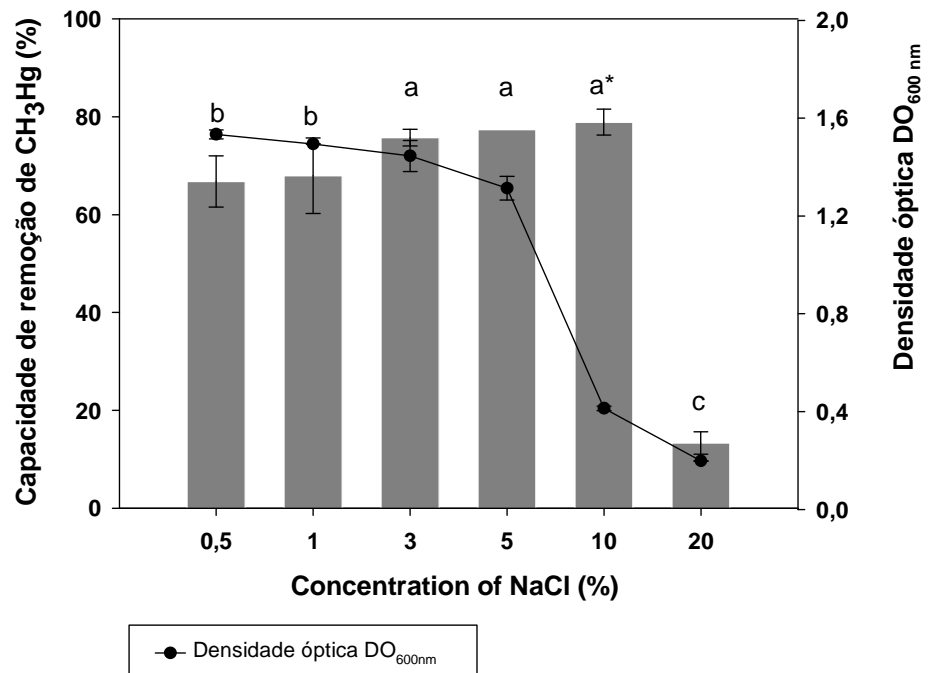


Figura 3.3. Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) em diferentes concentrações de NaCl (%) por *P. putida* V1 tolerante à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

No ambiente sob condições de alta salinidade, a concentração de aniões aumenta e as interações do mercúrio com os óxidos e superfícies de metais também aumenta permitindo uma rápida translocação, contudo pode haver uma redução a biodisponibilidade do mercúrio para bactéria resistentes a esse metal (Melamed e Villas Boas, 1998). Contudo, nesse estudo não foi observado diminuição na biodisponibilidade do mercúrio, pois *P. putida* V1 foi capaz de remover quase 80% do metilmercúrio presente no meio de cultivo quando submetida à 10% de NaCl. Essa quantidade de NaCl é 10 vezes maior do que a dose regularmente usado no meio LB. Sendo assim, *P. putida* V1 mostrou uma boa adaptação a altas condições salinas e a presença de NaCl não afetou negativamente a biodisponibilidade do metilmercúrio. Somente quando submetido a 20% de NaCl houve uma diminuição expressiva da capacidade de remoção de metilmercúrio e o crescimento

celular. A caracterização do crescimento de micro-organismos resistentes a metilmercúrio e o efeito na capacidade de remoção na presença de sais são aspectos importantes pois em ambientes aquáticos, o NaCl pode ser um co-poluinte e a presença dos sais pode interferir também na atividade da enzima mercúrio redutase (Canstein et al., 1999).

Os níveis de contaminação por metais pesados variam devido as fontes poluidoras e os tipos de ambientes (solo, sedimento, água etc.). As concentrações utilizadas nesse estudo foram padronizadas para 600 mM, o que equivale a: Cu = 38 mg kg⁻¹; Ni = 35 mg kg⁻¹; Pb = 124 mg kg⁻¹; Cr = 31 mg kg⁻¹. As concentrações de metais pesados utilizadas nesse estudo encontram-se dentro das faixas de contaminações encontradas no ambiente para estes elementos, que estão numa faixa média de 11 à 131 mg kg⁻¹ (Wang et al., 2007; Carvalho et al., 2006; Dudka et al. 1995). Apesar de que valores mais elevados de contaminação do ambiente por esses metais podem ser encontrados na literatura (acima de 500 mg Kg⁻¹) (Soares et al., 2001; Dudka et al. 1995), tais doses não podem ser utilizadas em experimentos porque são muito elevadas e extremamente tóxicas aos micro-organismos ou por serem tóxicas para manuseio em laboratório. Apesar das concentrações de metais pesados testadas estarem na faixa média encontrada em ambientes contaminados, no presente estudo observou-se que a concentração de metilmercúrio foi determinante para a sobrevivência dos micro-organismos. Observou-se que a concentração padrão utilizada nos experimentos de crescimento celular da *P. putida* V1 (2,3 µmol L⁻¹ de metilmercúrio), foi tóxica para a bactéria, e por esta razão foi escolhida uma dose menor de metilmercúrio. Assim, para a realização de futuros experimentos para validação do potencial de biorremediação de *P. putida* V1, a concentração de metilmercúrio deve ser o principal fator a ser considerado.

O crescimento de *P. putida* V1 foi muito similar nas concentrações de 100 e 300 µmol L⁻¹ de cobre sem metilmercúrio nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas, com um aumento médio entre 1.4 e 1.1 unidades DO_{600nm} (Figura 3.4A).

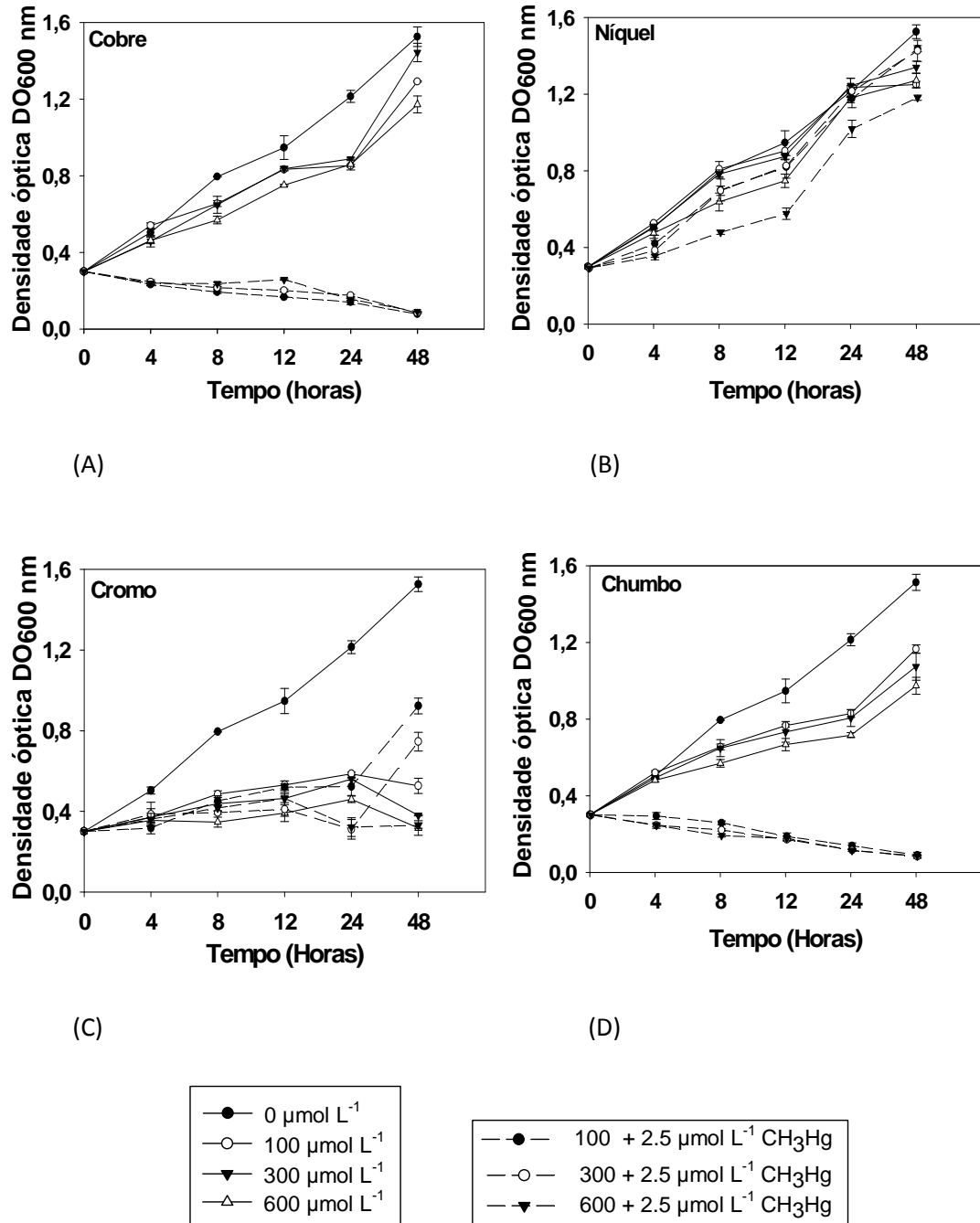


Figura 3.4. Crescimento celular de *P. putida* V1 em meio de cultura com e sem metilmercúrio contendo diferentes concentrações de (A) cobre, (B) Níquel, (C) Cromo, (D) Chumbo (0, 100, 300 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) após 48 horas de incubação à 29 °C. Barras de erro representam o desvio padrão da média.

Comparando a absorvância nas diferentes concentrações de cobre, observou-se que o crescimento celular de *P. putida* V1 foi muito similar entre as concentrações testadas deste metal nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas. Somente após 48 horas de incubação em caldo LB contendo $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cobre obteve-se um aumento na absorvância similar ao controle (aumento médio de 1,5 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$). No presente trabalho, observou-se que na presença de altas concentrações de cobre, *P. putida* V1 cresceu, sugerindo que esta bactéria possui algum mecanismo de resistência ao cobre. Por exemplo, esta resistência pode ser controlada pela atividade de metalotioneínas e chaperonas que retêm este metal no citosol (Silver e Phung, 2005). Contudo, quando adicionou-se $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio ao meio de cultivo contendo as concentrações 100, 300 e $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cobre, *P. putida* V1 não foi capaz de se multiplicar.

No caso do níquel, o crescimento de *P. putida* V1 foi muito similar nas concentrações de 100 e $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ deste metal com e sem metilmercúrio nos tempos 4, 8, 12 e 24 horas, com um aumento médio entre 1.4 e 1.1 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (Figura 3.4B). Metais como o níquel podem ser bioacumulados na célula, todavia, tal bioacumulação geralmente requer sistemas específicos de transporte e vai depender do grau de tolerância da célula ao metal (Garcia Jr e Bevilaqua, 2008). Diferente do presente estudo, Amor et al. (2001) ao avaliarem o efeito de alguns metais pesados (zinco, níquel e cádmio) na inibição da biodegração do tolueno em meio de cultura, observaram que o níquel foi o metal com maior influência negativa. Desta forma, ressalta-se que o sinergismo entre os contaminantes pode ser muito específico, pois no solo e na água ocorrem multicontaminações que pode afetar o comportamento do micro-organismo utilizado. Sendo assim, a presença de um composto pode inibir a transformação de outro para uma forma menos tóxica, mesmo que haja nesse ambiente uma microbiota competente para isso.

O crescimento de *P. putida* V1 foi muito similar em todas as concentrações de cromo testadas com e sem metilmercúrio nos tempos entre 4 e 24 horas, com um aumento médio entre 0,7 e 0,3 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$

(Figura 3.4C). Normalmente, as concentrações de cromo em água doce são baixas (CETESB, 2006), podendo-se apresentar principalmente na forma hexavalente, devido principalmente aos despejos industriais (Silva e Pedrozo, 2001). Já no solo, o cromo tem uma baixa mobilidade e é dificilmente lixiviado (Silva e Pedrozo, 2001). Entre os metais testados nesse estudo, *P. putida* V1 apresentou comportamento único na presença de cromo com adição de metilmercúrio. Cromo (III) é considerado um nutriente essencial para humano e animais, e não essencial para os microrganismos (Stearns, 2000; Vincent 2004). Comparativamente, a essencialidade do cromo é considerada uma incognita porque nenhuma enzima ou cofator que utiliza cromo foi identificado até o momento (Stearns, 2000; Vincent, 2010).

Já para chumbo o crescimento de *P. putida* V1 foi muito similar em todas as concentrações testadas nos tempos 4, 8, 12, 24 e 48 horas, com um aumento médio entre 1.1 e 0.9 unidades DO_{600nm} (Figura 3.4D). Quando adicionou-se $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio ao meio de cultivo contendo as concentrações de chumbo, *P. putida* V1 não foi capaz de se multiplicar. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a mistura de chumbo e cobre nas concentrações testadas na presença de metilmercúrio seja altamente tóxica para *P. putida* V1, inativando esta bactéria. O chumbo é citado como um dos metais presentes em diversos resíduos, como os de fábricas de papel (Tsutiya, 2006, Costa et al., 2002). Esse metal chega à água através das descargas de efluentes das indústrias (CETESB, 2006).

A capacidade de remoção de metilmercúrio (%) em baixa ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e alta concentração ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$) de cobre, níquel, cromo e chumbo ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por *P. putida* V1 é apresentada na Figura 3.5.

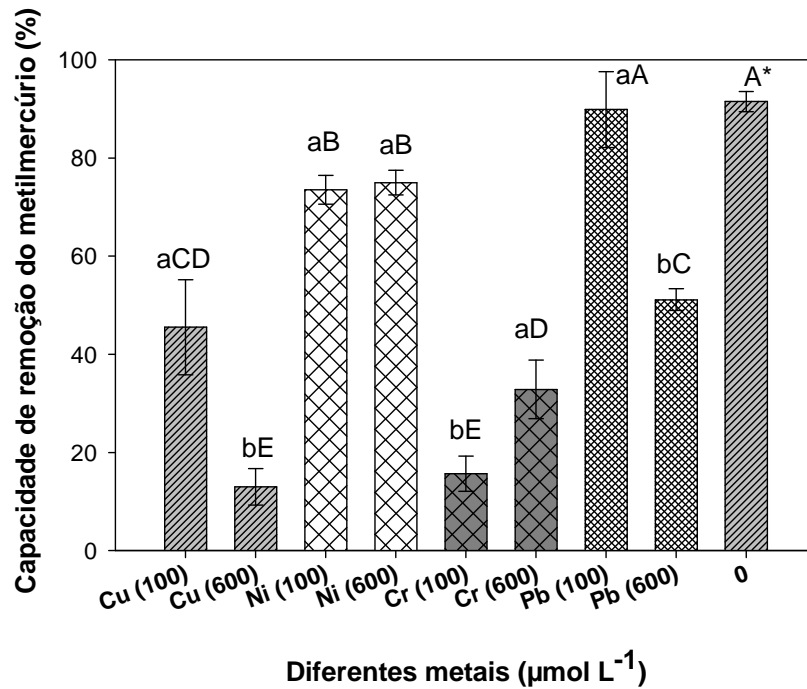


Figura 3.5. Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) em baixa e alta concentração de cobre, níquel, cromo e chumbo ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por *P. putida* V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t ($p < 0.05$). Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Houve diferença significativa entre as concentrações de metais testadas, exceto para níquel pelo teste t ($p < 0,05$) (Figura 3.5). O mais alto percentual de remoção de metilmercúrio pela *P. putida* V1 foi observada no controle (91%) ($p < 0,05$). *P. putida* V1 foi capaz de remover o metilmercúrio quando testou-se o caldo LB contendo chumbo em baixa concentração, muito similarmente ao controle (89%) ($p < 0,05$). *P. putida* V1 removeu grandes quantidades de metilmercúrio quando testou-se o meio LB contendo níquel em baixa e alta concentrações, 73 e 75% respectivamente, contudo diferindo estatisticamente do controle ($p < 0,05$). Os menores percentuais de remoção de metilmercúrio foram encontrados quando testou-se o meio LB contendo altas concentrações de cobre e cromo, diferindo estatisticamente do controle ($p < 0.05$).

Quando o caldo LB continha cobre em baixa ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e alta ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$) concentração, *P. putida* V1 removeu 45% e 12% de metilmercúrio, respectivamente. A adição de $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio culminou com a inativação da bactéria, sendo portanto essa mistura altamente tóxica. Quando testou-se a remoção de metilmercúrio em uma concentração mais baixa desse composto ($0.008 \mu\text{mol L}^{-1}$) observou-se que *P. putida* V1 foi capaz de crescer. Apesar disto, a remoção de metilmercúrio foi baixa, ou seja, inferior ao controle e a de outros metais como níquel e chumbo. Uma hipótese para explicar esse comportamento, seria que esse metal possa ter inibido a síntese do operon *mer*, principalmente do *merB* responsável pela transformação de organomercuriais.

No caso do níquel, quando testou-se o caldo LB contendo esse composto em baixa e alta concentração, não houve diferença significativa na capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 ($p < 0.05$). Foram observados percentuais de remoção de metilmercúrio muito similares por *P. putida* V1 entre a baixa (75%) e alta concentração (73%) deste metal. Deve-se ressaltar que a alta concentração de níquel não afetou a capacidade de remoção de metilmercúrio pela *P. putida* V1.

A adição do cromo ao meio de cultura mostrou uma tendência diferente quando comparada a capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 *in vitro* na presença de outros metais. Quando testou-se o LB contendo baixa concentração desse composto, *P. putida* V1 foi capaz de remover somente 15% de metilmercúrio, enquanto que quando o meio de cultura continha alta concentração de cromo, esta bactéria removeu 32% do metilmercúrio presente. No caso do chumbo, observou-se que o mais alto percentual de remoção de metilmercúrio pela *P. putida* V1 (89%), ocorreu quando testou-se o LB contendo baixa concentração de chumbo, enquanto que na alta concentração desse composto ocorreu um baixo percentual de remoção (51%). Uma hipótese para explicar a alta remoção de metilmercúrio em presença de chumbo, é que essa bactéria, possa metilar o chumbo além do Hg. Isso ocorre por meio de uma reação enzimática com a transferência de

um grupo metil para uma molécula e o composto metilado formado difere em solubilidade, volatilidade e toxidez (Camargo et al., 2007).

Deve-se considerar que a resistência bacteriana a metais pesados pode estar associada em muitos casos a estruturas celulares que anulam a toxidez do metal, seja por processos celulares, tais como a imobilização na superfície da célula ou no meio extracelular (Wang et al., 2009). Esses testes possibilitaram observar a capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 e o comportamento desta bactéria quando o meio LB continha metais pesados. O estudo das combinações de diferentes metais e sua influência no comportamento de uma bactéria para uso em biorremediação é extremamente importante, pois em muitas situações podem ocorrer multicontaminações no ambiente e a capacidade do micro-organismo alvo em resistir à presença de outro metal é um fator importante. Além disso, os processos de biorremediação são muito complexos no ambiente, pois envolvem interações químicas, físicas e biológicas que estão ocorrendo simultaneamente. Em condições de laboratório, procura-se simular algumas situações passíveis de serem avaliadas, que não necessariamente representam fielmente o que ocorre no ambiente. Sendo assim, estudos adicionais devem ser realizados para validação dos resultados encontrados nesse trabalho, como por exemplo, uso de bioreatores e estudo em microcosmos.

4.4 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem *P. putida* V1 como uma promissora candidata para biorremediação de ecossistemas contaminados com metilmercúrio, que apresentam alta salinidade (< 10%) e outros metais pesados, como níquel e chumbo. A presença de altas concentrações de molibdato e fosfato reduziram o crescimento de *P.putida* V1, enquanto que o nitrato estimulou o crescimento e a presença de sulfato praticamente não afetou o crescimento dessa cepa bacteriana. Apesar dos sais e metais pesados estudados influenciarem o crescimento e a remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1, observou-se que a concentração de metilmercúrio é determinante para a sobrevivência desta bactéria.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMOR, L.; KENNES, C.; VEIGA, M.C. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 78, n.2, p.181-185, 2001.

ANDERSEN, M.K.; JENSEN, L.S. Low soil temperature effects on short-term Gross N mineralisation-immobilisation turnover after incorporation of a green manure. **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v. 33, n.4-5, p.511-521, 2001.

BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. **Campo-Território: revista de geografia agrária**, Uberlândia, v.1, n.2, p.123-151, 2006.

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

BUSTAMANTE, M.A.O. et al. Nitrogen and potassium variation on contaminant removal for a vertical subsurface flow lab scale constructed wetland. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 102, n.17, p.7745–7754, 2011.

BERTOL, O.J. et al. Mobilidade de P, Cu e Zn em colunas de solo sob sistema de semeadura direta submetido às adubações mineral e orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, n.6, p.1841-1850, 2010.

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

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

CARVALHO, L.M.; CAÇADOR, I.; LOUÇÃO, A.M. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance root cadmium and copper accumulation in the roots of the salt marsh plant *Aster tripolium* L. **Plant Soil**, Hoboken,v. 285, p.161–169, 2006.

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL). **Variáveis de Qualidade das Águas**. 2006. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

CHOI, B-Y. et al. Sources and biogeochemical behavior of nitrate and sulfate in an alluvial aquifer: Hydrochemical and stable isotope approaches. **Applied Geochemistry**, Amsterdam , v.26, n.7, p.1249–1260, 2011.

CHOI, S.C.; BARTHA, R. Cobalamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v.59, n.1, p.290-295, 1993.

COSTA, A. S. V. et al. Efeitos do resíduo de celulose nas características químicas dos solos e no desenvolvimento de culturas agrícolas. In: CONGRESSO ANUAL DE CELULOSE E PAPEL, 35., 2002, São Paulo. [**Anais ...**]. São Paulo: ABTCP, 2002. p.1-15.

DARWISH, T. et al. Observations on soil and groundwater contamination with nitrate: a case study from Lebanon-East Mediterranean. **Agricultural Water Management**, Amsterdam, v.99, n.1, p.74– 84, 2011.

DEUNERT, F., LENNARTZ, B., TIEMEYER, B. Legislative effects on the development of surface water quality in rural areas in Northern Germany. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v.15, n.16, p.1507-1513, 2003.

DUDKA, S.; PIOTROWSKA, M.; TERELAK, H. Transfer of cadmium, lead, and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v.94, n.2, p.181-188, 1996.

FAO Salt-affected soils and their management. Rome, 1988. (FAO, Soils Bulletin, 39)

FERREIRA, D.F. Análise estatística por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOMETRIA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE

BIOMETRIA, 45, 2000. São Carlos. **Programas e Resumos...** São Carlos, SP: UFSCar, 2000. p.235.

GARCIA Jr, O.; BEVILAQUA, B. Microrganismos, minerais e metais. In: MICROBIOLOGIA Ambiental. 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 2008, p.49-82.

HANSEN, K.H., ANGELIDAKI, I., AHRING, B.K. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. **Water Research**, Amsterdam, v.32, n.1, p.5–12, 1998.

ISHERWOOD, K. F. **Mineral fertilizer use and the environment**. Paris: International Fertilizer Industry Association Revised Edition. 2000. 53 p.

JENSEN, S.; JERNELÖV, A. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. **Nature**, London, v.223, n.5207, p.753-754, 1969.

JU, T., KOU, L., ZHANG, S., CHRISTIE, P. Nitrogen balance and groundwater nitrate contamination: comparison among three intensive cropping systems on the North China Plain. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v.143, n.1, p.117–125, 2006.

KAISER, B.N. et al. The Role of Molybdenum in Agricultural Plant Production **Annals of Botany**, New York, v.96, n.5, p.745–754, 2005.

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 Índia. **Science of the Total Environment**. Washington, v. 367, n.1, p. 341-353, 2006.

KING, J.K. et al. Sulfate-reducing bacteria methylate mercury at variable rates in pure culture and in marine sediments. **Applied Environmental Microbiology**, Washington. v.66, v.6, p.2430-2437, 2000.

KROS, J. et al. Integrated analysis of the effects of agricultural management on nitrogen fluxes at landscape scale **Environmental Pollution**, Amsterdam, v.159, n.11, p.3171-3182, 2011.

LI, W. et al. A comparative analysis of environmental quality assessment methods for heavy metal-contaminated soils. **Pedosphere**, Beijing, v.18, n.3, p.344–352, 2008.

MAVI, M.S. et al. J. Salinity and sodicity affect soil respiration and dissolved organic matter dynamics differentially in soils varying in texture **Soil Biology & Biochemistry**, Amsterdam, v.43, n.9, p.8-13, 2012.

MAHVI, A.H. et al. Agricultural activities impact on groundwater nitrate pollution. *Int. J. Environmental Science and Technology*, Washington, v.2, n.1, p.41–47, 2005.

MELAMED, R.; VILLAS BÖAS, 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, , 2002. p.48. (Série Tecnologia Ambiental)

METTERNICHT, G.I.; ZINCK, J.A. Remote sensing of soil salinity: potentials and constraints. **Remote Sensing of Environment**, Amsterdam, v.85, n.1, p.1–20, 2003.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O . **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. p.729.

McBRIDE, M.B. **Environmental Chemistry of Soil**. New York: Oxford University Press, 1994. 406p.

NAKAMURA, K. et al. Removal of mercury from mercury-contaminated sediments using a combined method of chemical leaching and volatilization of mercury by bacteria. **Biodegradation**, New York, v.10, n.6, p.443–447, 1999.

RAWLINS, B.G., WEBSTER, R., LISTER, T.R. The influence of parent material on topsoil geochemistry in Eastern England. **Earth Surface Processes and Landforms**, Hoboken, v.28, n.13, p.1389–1409, 2003.

RAY, C. Managing nitrate problems for domestic wells in irrigated alluvial aquifers. **Journal of Irrigation and Drainage Engineering**. Reston, v.127, n.1, p. 49–53, 2001.

RINCÓN, J.R.T. et al. Evaluación del molibdato y nitrato sobre bacterias sulfato-reductoras asociadas a procesos de corrosión en sistemas industriales **Revista Argentina de Microbiología**, Buenos Aires, v.40, n.1, 52-62, 2008.

RHEINHEIMER, D.S. et al. Resposta de culturas à aplicação de enxofre e a teores de sulfato num solo de textura arenosa sob plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, p.562-569, 2005.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotecnologia do solo**. Brasília: MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, 1988, p. 125-177.

SILVA, C. S.; PEDROZO, M. F. M. **Ecotoxicologia do cromo e seus compostos**. Salvador: CRA – Centro de Recursos Ambientais, 2001. (Série Cadernos de Referência Ambiental do CRA, v.5).

SCHRODER, J.J. et al. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in developing indicators for regulation. **Environmental Science and Policy**, Amsterdam, v.7, n.1,p.15-23, 2004.

SOARES, C.R.F.S. et al. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.13, n.3, p.302-315, 2000.

STEARNS, D.M. Is chromium a trace essential metal? **Biofactors**, Hoboken, v.11, n.3, p.149–162, 2000.

TSUTIYA, M. T. **Limites de metais pesados em biossólidos para uso agrícola proposta para a regulamentação federal e estadual**. Disponível em: <http://www.aesabesp.com.br/encontro_exemplo_2006.pdf>. Acesso em: 28/01/2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **SW-846, Method 7471B, Mercury in Solid or Semisolid Waste** (Manual Cold Vapor Technique). Washington, DC, 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **CERCLA: Priority list of hazardous substances**. Washington, DC, 2007.

VINCENT, J.B. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? **Dalton Transactions**, Cambridge, v.39, n.16, p.3787–3794, 2010.

WANG, F.Y.,LIN, X.G., YIN, R. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. **Pedobiologia** Amsterdam, v.51, n.2, p. 99-109, 2007.

WANG X. et al. Gellan gel beads containing magnetic nanoparticles: an effective biosorbent for the removal of heavy metals from aqueous system. U.S. Patent 7. **Bioresource technology**, Amsterdam,v. 100, n.7, 2009.

WU, H. et al. Eutrophication mitigation strategies: perspectives from the quantification of phosphorus flows in socioeconomic system of Feixi, Central China **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v.23, n.1, p.122-137, 2012.

ZHANG, H.C.; CAO, Z.H.; SHEN, Q.R.; WONG, M.H Effect of phosphate fertilizer application on phosphorus (P) losses from paddy soils in Taihu Lake Region I. Effect of phosphate fertilizer rate on P losses from paddy soil. **Chemosphere**, Amsterdam, v.50, n.6, p 695–701, 2003.

CAPÍTULO IV

**TRANSFORMAÇÃO DE METILMERCÚRIO POR *Pseudomonas putida* V1
A PARTIR DE COMPOSTOS MERCURIAIS, DETECÇÃO DA ENZIMA
ORGANOMERCURIO LIASE E DOS GENES *merA* E *merB***

5.1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente por metais pesados tem se intensificado nas últimas décadas com o aumento, principalmente, das atividades industriais. Entre os metais que mais demandam atenção da sociedade destaca-se o mercúrio devido a sua alta toxicidade e efeitos negativos à saúde humana (EPA, 2007). A exposição ao mercúrio pode resultar em diversos problemas aos animais e plantas, já nos seres humanos pode ocasionar danos ao fígado e rim, câncer, lesões na pele, danos ao sistema nervoso, entre outros (WHO, 1990; Clarkson, 2002; UNEP, 2002). A toxicidade do mercúrio para os organismos vivos depende consideravelmente de suas formas químicas e as três formas encontradas no ambiente são: mercúrio elementar, compostos inorgânicos (como cloreto de mercúrio, Hg_2Cl e compostos orgânicos (como metilmercúrio CH_3Hg ; $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, fenilmercúrio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOOCCH}_3$), timerosal ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$).

Apesar dos compostos inorgânicos serem encontrados em maiores concentrações nos locais contaminados por apresentarem ampla aplicação no setor industrial (indústria de eletrônicos, equipamentos de medição, tintas e cloro-soda) os compostos orgânicos são os mais importantes sob o ponto de vista toxicológico, principalmente os que contêm radicais de cadeia curta, como metil, etil e propil (Maxson, 2005; Barkay et al., 2003). O timerosal é um exemplo desses compostos orgânicos e tem sido utilizado há décadas como preservante de produtos medicinais líquidos e vacinas (Budhathoki et al., 2011). O acetato de fenilmercúrio foi utilizado como um catalisador de resinas de poliuretano e como fungicida agrícola (Beaulieu e Beaulieu, 2008).

Apesar dos efeitos deletérios à saúde humana e ao meio ambiente advindos da exposição prolongada a esses compostos, bactérias presentes em ambientes contaminados com mercúrio podem desenvolver resistência e servirem como importantes agentes no processo de remediação. Diversos estudos tem reportado o isolamento, identificação e caracterização de bactérias resistentes a diversos metais, incluindo o mercúrio e seus compostos (Henriette et al. 1991; Nakamura et al., 1999, Chatziefthimou et al., 2007, Ball et al., 2007; Giovanella et al., 2011). Deve-se ressaltar que os compostos de mercúrio podem ocorrer no ambiente sob várias formas, e essas formas podem influenciar o mecanismo de resistência microbiana. Para ser utilizado em estratégias de remediação, espera-se que um micro-organismo apresente resistência aos diversos compostos de mercúrio presente no ambiente.

A resistência microbiana ao mercúrio pode ocorrer por meio de mecanismos como bombas de efluxo, quelação por polímeros enzimáticos, precipitação, biometilação (Boening, 2000). Todavia, o mecanismo de resistência a esse metal mais estudado é o de redução enzimática, relacionado ao operon *mer* (Barkay et al., 2003). A frequência dos genes *mer* nas bactérias isoladas de sedimentos correlaciona-se positivamente com as concentrações de mercúrio presentes nestes ambientes (Barkay e Olson, 1986). Assim, a detecção do gene *mer* em bactérias isoladas de ambientes contaminados com mercúrio e estudo do mecanismo de degradação do mercúrio por estas bactérias, pode fornecer informações importantes sobre o seu potencial para aplicações em bioremediação.

Sabe-se que o mecanismo de redução enzimática relacionado ao operon *mer* é governado por duas enzimas principais codificadas pelos genes *merB* e *merA*, a organomercurio liase e mercurio redutase, respectivamente (Osborn, et al. 1994; Barkay et al., 2003; Wang et al., 2011). Enquanto o *merB* quebra o carbono vinculado ao Hg presente em compostos organomercuriais, tais como o acetato de fenilmercúrio e o metilmercúrio, o *merA* é responsável por reduzir o Hg^{+2} liberado pela ação da mercurio redutase para a forma volátil e menos tóxica de mercúrio Hg^0 (Schottel, 1978; Tezuka e Tonomura, 1978; Nakamura et al., 1990; Misra, 1992; Pahan et al.,

1993; Barkay et al., 2003). Além disso, o metilmercúrio pode ser degradado a mercúrio elementar (Hg^0), liberando CH_4 e sob certas condições oxidativas (demetilação), a degradação de metilmercúrio pode produzir CO_2 (Barkay et al., 2003).

Para a identificação dos genes do *mer* operon recorre-se a ferramentas baseadas em biologia molecular, como reações de PCR e sequenciamento (Wang et al., 2011). Todavia, sabe-se que nem sempre os genes estudados são identificados através destas técnicas, especialmente no caso do gene *merB*, que possui uma maior diversidade genética (Barkay e Wagner-Döbler, 2005). Esta diversidade genética do gene *merB* resulta na presença de regiões pouco conservadas, que pode afetar a sua amplificação na reação de PCR, o que resulta em falsos resultados negativos (Barkay e Wagner-Döbler, 2005). Além disso, sabe-se que a presença do gene não assegura que este seja expresso (Wang et al., 2011). Nestes casos, técnicas como aquelas baseadas em radioisótopos ($^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$, ^{203}Hg) podem ser utilizadas. Por meio dessas técnicas, que utilizam traçadores radioativos, é possível acompanhar os metabolitos produzidos, pois o radioisótopo quando absorvido pelos micro-organismos ou sedimentos, permite sua localização no final das reações (Barkay e Wagner-Döbler, 2005, Kiene et al., 1986, Oremland e Zehr, 1986). Para estudar o metabolismo de bactérias resistentes à metilmercúrio, utiliza-se o radioisótopo $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$, pois na degradação de metilmercúrio pelo *merB* ocorre a produção CH_4 e de uma pequena quantidade de CO_2 (Choi et al., 1994; Pak e Bartha, 1999; Hintelmann et al., 2000). Sendo assim com a presença de $^{14}\text{CH}_4$ e a expressão moderada de $^{14}\text{CO}_2$, pode-se avaliar se o mecanismo de resistência estudado em determinado micro-organismo é mesmo o sistema *mer* operon.

Tendo em vista o acima exposto, o estudo do comportamento (crescimento celular e capacidade de remoção de mercúrio) de uma cepa (*P. putida V1*) com potencial para utilização em processos de biorremediação frente a compostos organomercuriais e a mercúrio inorgânico e a avaliação da presença dos genes *merA* e *merB* envolvidos na transformação do mercúrio orgânico constituem-se informações primordiais para estudos de

bioprospecção. Além disso, o estudo do mecanismo envolvido na transformação do mercúrio orgânico compreende etapa fundamental para se entender como o metabolismo da bactéria pode ser afetado e os potenciais impactos sobre a eficiência do processo de biorremediação. Deve-se incluir também a possibilidade de que novos mecanismos estejam envolvidos na transformação do mercúrio orgânico. Deste modo, o presente estudo teve por objetivo determinar a influência de timerosal, fenilmercúrio e cloreto de mercúrio sobre a capacidade de remoção e crescimento de *P. putida* V1 em condições *in vitro*, determinar se este isolado possui os genes *merA* e *merB* e a expressão da enzima organomercurio liase, bem como avaliar a degradação/transformação de metilmercúrio de *P. putida* V1 com marcadores radioativos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

P. putida V1 foi isolada de solo proveniente do *Landfarming* de um pólo petroquímico localizado no estado do Rio Grande do Sul, conforme descrito no Capítulo II. O pré-inóculo foi preparado a partir de uma alçada de *P. putida* V1 inoculada em meio Luria Bertani (LB) contendo $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio (CH_3Hg), seguindo-se incubação por 24 h à 29°C sob agitação de 100 rpm. Para utilização nos experimentos, o meio de cultura foi inoculado com uma alíquota do pré-inóculo de *P. putida* V1 necessária para se obter uma absorbância de 0.3 a 600 nm em meio LB, correspondente a aprox. 2×10^7 UFC/mL.

As soluções estoques de timerosal, fenilmercúrio, cloreto de mercúrio ($50, 12,5, 50 \text{ mmol L}^{-1}$, respectivamente) foram preparadas diluindo-se a quantidade de timerosal ($\text{C}_9\text{H}_9\text{HgNaO}_2\text{S}$), acetato de fenilmercúrio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOOCCH}_3$) e cloreto de mercúrio (HgCl_2) em água ultrapura estéril contendo $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido clorídrico (HCl) e posteriormente transferindo-se a quantidade adequada para se atingir a concentração necessária no caldo LB. Todo este procedimento foi realizado em condições assépticas.

Para determinar a capacidade de crescimento de *P. putida* V1 em presença de metilmercúrio, foi realizada a inoculação desse isolado em caldo LB, utilizando uma alíquota do pré-inóculo como descrito anteriormente. Posteriormente 25 mL de caldo LB inoculado contendo $2,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio foram adicionados em Erlenmeyers e incubados à 29°C . O

crescimento celular durante 24 horas de incubação foi mensurado através de densidade óptica ($OD_{600\text{ nm}}$) em diferentes intervalos de tempo: 0, 4, 8, 12 e 24 hs. Nestes intervalos de tempo, amostras de caldo LB foram removidas para determinação do mercúrio remanescente no meio de cultivo e as leituras do mercúrio presente na solução armadilha foram determinados como descrito no item anterior. O caldo LB sem metilmercúrio, mas inoculado com *P. putida* V1, foi utilizado como controle positivo, para estimar o crescimento de *P. putida* V1 na ausência de metilmercúrio. Tubos contendo meio LB e metilmercúrio ($2,3\ \mu\text{mol L}^{-1}$), sem inóculo constituíram os controles negativos.

Para determinação da capacidade de remoção de timerosal, fenilmercúrio, cloreto de mercúrio do meio de cultivo por *P. putida* V1, este isolado foi adicionado ao meio LB, utilizando uma alíquota do pré-inóculo como descrito anteriormente. Posteriormente, 15 mL de caldo LB inoculado foi distribuído em frascos de 50 mL. Os frascos contendo caldo LB inoculado com *P. putida* V1, com diferentes concentrações de timerosal, fenilmercúrio, cloreto de mercúrio, foram incubados à $29\ ^\circ\text{C}$ por 24 horas. Caldo LB adicionado com timerosal, fenilmercúrio, cloreto de mercúrio, sem inóculo constituíram os controles negativos. Antes da quantificação do mercúrio remanescente por vapor a frio, as amostras foram digeridas pelos métodos 245.1 EPA. As análises do mercúrio foram realizadas por espectrofotometria de absorção atômica/vapor frio (Perkin Elmer - Analyst 100).

O crescimento de *P. putida* V1 na presença de timerosal, fenilmercúrio, cloreto de mercúrio, foi determinada em caldo LB. A inoculação de *P. putida* V1 no caldo LB foi realizada com uma alíquota do pré-inóculo como descrito no item anterior. As soluções de cada metal nas concentrações ($50, 100, 150$ e $200\ \mu\text{mol L}^{-1}$) de cada composto foram adicionadas em tubos de ensaio, previamente limpos e esterilizados. Posteriormente 15 mL de caldo LB inoculado com *P. putida* V1 foi distribuído nos tubos de ensaio e incubado à $29\ ^\circ\text{C}$ por 24 horas. Estas concentrações foram esc olhidas baseando-se em estudos de concentração mínima inibitória descrita no Capítulo II. Os estudos foram conduzidos em placas de Elisa utilizando timerosal, fenilmercúrio e cloreto de mercúrio, variando as concentrações entre 50 à $250\ \text{mmol L}^{-1}$. Os

resultados preliminares de inibição celular demonstraram que *P. putida* V1 cresceu em meio de cultura contendo entre 50 à 200 mmol L⁻¹ destes compostos. Desta forma, estas concentrações foram escolhidas para utilização no presente estudo. O crescimento foi mensurado através de densidade óptica (OD_{600 nm}) em diferentes intervalos de tempo: 0, 4, 8, 12, 24 e 48 hs. O caldo LB sem timerosal, fenilmercúrio, cloreto de mercúrio (inoculado com *P. putida* V1) foi utilizado como controle positivo.

Para a quantificação do Hg⁰ emitido na transformação do metilmercúrio após 24 horas de incubação por *P. putida* V1, foi realizada a inoculação desse isolado bacteriano em caldo LB utilizando uma alíquota do pré-inóculo como descrito no item anterior. Controles com células mortas de *P. putida* V1 foram utilizados para avaliar se ocorreriam perdas abióticas. Para isso, os frascos foram levados ao banho-maria após a inoculação, onde permaneceram por 30 à 40 minutos à 80°C. Foi adicionado 0,008 µmol L⁻¹ de metilmercúrio nos controle e amostras, sendo após vedados os frascos com rolhas plásticas e cobertos com papel alumínio e incubados à 29 °C por 24 horas. Em estudos preliminares, observou-se que *P. putida* V1 foi capaz de crescer nessas condições com restrição de oxigênio. As soluções armadilhas a serem utilizadas nesse experimento para captura do Hg⁰, foram feitas em frascos de penicilina de 50 mL, os quais continham 10 mL de uma mistura com 0,6% permanganato de potássio, 2,5% de ácido sulfúrico, ácido nítrico 2,5%. Após 24 horas de incubação, as amostras foram dispostas ao lado das suas respectivas armadilhas. Então, conectou-se cada amostra à sua armadilha utilizando-se tubos com seringas acopladas em cada extremidade. Nesta etapa, cada tubo foi conectado primeiramente à armadilha e posteriormente à amostra, sendo a mesma introduzida lentamente para evitar a perda de Hg⁰. As amostras permaneceram sob borbulhamento com nitrogênio por uma hora, para que todo o Hg⁰ fosse capturado pela armadilha. O mercúrio remanescente no meio de cultivo e as leituras do mercúrio presente na solução armadilha foram determinados como descrito no item anterior.

Para determinação do mercúrio remanescente no meio de cultivo após 24 horas de incubação, os frascos contendo meio LB inoculado com *P. putida* V1 foram colocados em capela de exaustão de gases, onde permaneceram por 10 minutos para a retirada do Hg volátil (Hg^0). As amostras foram digeridas pelo método EPA 245.1 antes da análise de mercúrio por vapor a frio. Após o período em capela de exaustão, os frascos foram agitados levemente e retirou-se uma alíquota do sobrenadante e de suspensão celular (200 μL), seguindo-se a adição de 1 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e 1 mL ácido nítrico (HNO_3). Além disso, foram adicionados 0,2 mL de permanganato de potássio (KMnO_4) em todas as amostras, que foram posteriormente aquecidas em banho-maria à 65 °C por 2 horas. Após este período, o permanganato de potássio remanescente foi reduzido com 0,4 mL de 10% hidroxilamida (CINH_2OH_2) e as amostras foram diluídas em HCl 2% para um volume final de 10 mL. Para as soluções armadilhas descritas no item anterior, o permanganato de potássio remanescente das soluções foi reduzido com 6 mL de 10% hidroxilamida (CINH_2OH_2). O mercúrio remanescente do meio de cultivo e o mercúrio presente nas soluções armadilhas do item anterior foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica/vapor frio (Perkin Elmer - Analyst 100). As análises do mercúrio remanescente foram expressos em percentual de remoção de metilmercúrio e o do mercúrio presente nas soluções armadilhas foram expressos em mercúrio presente na armadilha da amostra e controle (ppb).

Para a determinação da presença da organomercurio liase no isolado foi obtido o extrato bruto intracelular de *P. putida* V1. Para isso, utilizando-se frascos contendo 125 mL de caldo LB inoculados com uma alíquota do pré-inóculo de *P. putida* V1 como descrito anteriormente e com 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio. Os frascos foram incubados à 29 °C por 4 horas, após esse período adicionou-se novamente 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de metilmercúrio ao caldo LB inoculado com *P. putida* V1, os frascos foram mantidos nas mesmas condições de incubação descritas anteriormente, onde permaneceu por mais 20 horas. Após a incubação, centrifugou-se o caldo LB por 10 min a 10000 rpm a 4 °C e descartou-se o sobrenadante, com as células sendo ressuspensas em tampão fosfato de sódio (50 mmol L^{-1} , pH

7,35). Os procedimentos de centrifugação, lavagem e ressuspensão das células foram repetidos por três vezes. O sobrenadante proveniente da terceira lavagem foi descartado, e 20 mL de tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,35) foi adicionado a suspensão de células. Posteriormente, colocou-se o frasco em banho de gelo e às células foram submetidas a 6 pulsos de 35 W em ultrassom para rompimento celular. Em seguida centrifugou-se o extrato celular por 45 min à 10000 rpm. O sobrenadante foi mantido para os ensaios enzimáticos e o pellet com os restos celulares foi descartado.

A atividade da enzima organomercurio liase da *P. putida* V1 foi determinada utilizando-se o protocolo descrito por Takeuchi et al. (2005) com modificações. O volume utilizado na reação foi de 3 mL, contendo 0.5 mmol L⁻¹ de Na₂EDTA, 0.2 mmol L⁻¹ de MgSO₄. 7H₂O, 1 mmol L⁻¹ de βmercaptoetanol, enquanto que os volumes de metilmercúrio adicionados, variaram entre 3, 6, 12 e 18 µL, com concentrações de 250, 0,25, 0,025, 0,0125 µmol L⁻¹. O volume final da reação foi completado com tampão fosfato de sódio (100 mmol L⁻¹, pH 7,35) para 3 mL. A mistura foi incubada à 37 °C por 10 min para homogenizar a temperatura da mistura, pois quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação. O extrato bruto da *P. putida* V1 e NADPH foram adicionados somente após o período de incubação. A quantidade de extrato bruto variou entre 50, 100 e 200 µL e foi adicionado NADPH 0,08 mM. A atividade da enzima organomercurio liase de *P. putida* V1 foi determinada em espectrofotômetro a 340 nm pelo monitoramento da queda da absorbância (oxidação do NADPH) (Anexo I).

Para amplificação do gene *merA* foram utilizados DNA genômico e plasmidial e os primers desenhados por Wang et al., 2011. Os primers utilizados foram 214F(5'- ATC CGC AAG TNG CVA CBG TNG - 3') e 215R (5'- CGC YGC RAG CTT YAA YCY RRC CAT- 3'), 216F (5'- CCA TCG GCG GCA CYT GCG TYA- 3') e 215R (5'- CGC YGC RAG CTT YAA YCY RRC CAT- 3'), 217F (CGT SAA CGT SGG STG CGT GCC STC CA) e 218R (CGA GCY TKA RSS CYT CGG MCA KSG TC). A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL 10x PCR buffer, 1,5 µL de

25 mM MgCl₂, 1 µL de 10 mM dNTPs, 0,25 µL de *Taq* DNA polymerase (Sigma-Aldrich), 0,5 µL de 20 pmol/ µL de cada primer (forward e reverse) e 16,75 µL of diH₂O. Os ciclos de amplificação foram executados em termociclador (Eppendorf®) que correspondem a 30 segundos à 94 °C, 30 segundos à 50 °C, 30 segundos à 72 °C e uma extensão final à 72 °C por 7 minutos, por um total de 35 ciclos. O controle positivo da reação continha *Escherichia coli* JM109 (possui um plasmídeo do sistema *mera*) e o controle negativo foi água ultra pura autoclavada. Os resultados obtidos da reação de PCR foram expressos como positivo (+) quando observou-se presença de bandas no gel de agarose, e como negativo (-) quando houve ausência de bandas no gel de agarose. Os produtos de PCR foram purificados usando o protocolo Gen Elute (Gel Extraction Kit). As amostras foram enviadas para a empresa IDT (Integrated DNA Technologies) para o posterior sequenciamento do DNA. Todas as sequências foram submetidas no Genbank/NCBI database.

Primers utilizados em estudos prévios e desenhados especificamente para *Pseudomonas* sp., foram utilizados na tentativa de amplificar *merB* em *P.putida* V1 (Tabela 4.1). A reação de amplificação foi realizada em volume final de 25 µL, contendo 5 µL 10x PCR buffer, 1,5 µL de 25 mM MgCl₂, 1 µL de 10 mM dNTPs, 0,25 µL de *Taq* DNA polymerase (Sigma-Aldrich), 0,5 µL de 20 pmol/ µL de cada primer (forward e reverse) e 16,75 µL of diH₂O. Os ciclos de amplificação foram executados em termociclador (Eppendorf®) segundo Lessinger & Azeredo-Espin (2000), que correspondem a 10 segundos à 94 °C, 30 segundos à 41 °C, 60 segundos à 72 °C e uma extensão final à 72 °C por 5 minutos, por um total de 35 ciclos. O controle positivo da reação continha *Pseudomonas stutzeri* OX (Reniero et al. 1995, 1998) (possui um operon *mer* caracterizado) e o controle negativo da reação foi água ultra pura autoclavada. Os resultados obtidos da reação de PCR foram expressos como positivo (+) quando observou-se presença de bandas no gel de agarose, e como negativo (-) quando houve ausência de bandas no gel de agarose.

Tabela 4.1. Primers utilizados em outros estudos de resistência a metilmercúrio para detectar o gene *merB* de *Pseudomonas* sp.

Primer	Sequência (5' - 3')	Referência
B1.F	TGT GCC CTK GAC ACC YTK AT	Tamar Barkay,
B2-n.R	ACA GAC GCA AAG AAA TGB AC	Dados não publicados
B3-p.R	GTC ACG ATT GAG ACR ACG GC	
K62B1F	AAACATATGGACAAGACTATTTATTCC	Chien et al., 2010
K62B1R	AAAGGATCCTGACGCAAGCATCATCAG	
K62B2R	AAACATATGAAGCTCGCCCCATATATT	Chien et al., 2010
K62B2F	AAAGGATCCGATGCCGGTGCCGTAGAA	

Devido a não amplificação do gene *merB* na reação de PCR utilizando os primers apresentados da Tabela 4.1, novos primers foram desenhados. Primeiramente, foram realizadas pesquisas no Genbank em busca de micro-organismos que possuem o *merB* e principalmente por sequências provenientes de amostras ambientais conforme descrito por Wang et al. (2011). As sequências dos genes foram submetidas ao BLASTN (Altschul et al. 1990) e aquelas com mais alta similaridade foram alinhadas usando ClustalX (Versão 1,83) (Thompson et al. 1994). A árvore filogenética gerada foi avaliada usando o método de Neighbor-Joining e o programa Treeview foi utilizado para visualizar a árvore de topologias (Figura 4.1). De acordo com os agrupamentos formados na árvore filogenética, foram escolhidos os agrupamentos nos quais isolados de *Pseudomonas* sp. estivessem presentes. Foram selecionados os isolados que apresentaram regiões conservadas entre si quando submetidos so ClustalX.

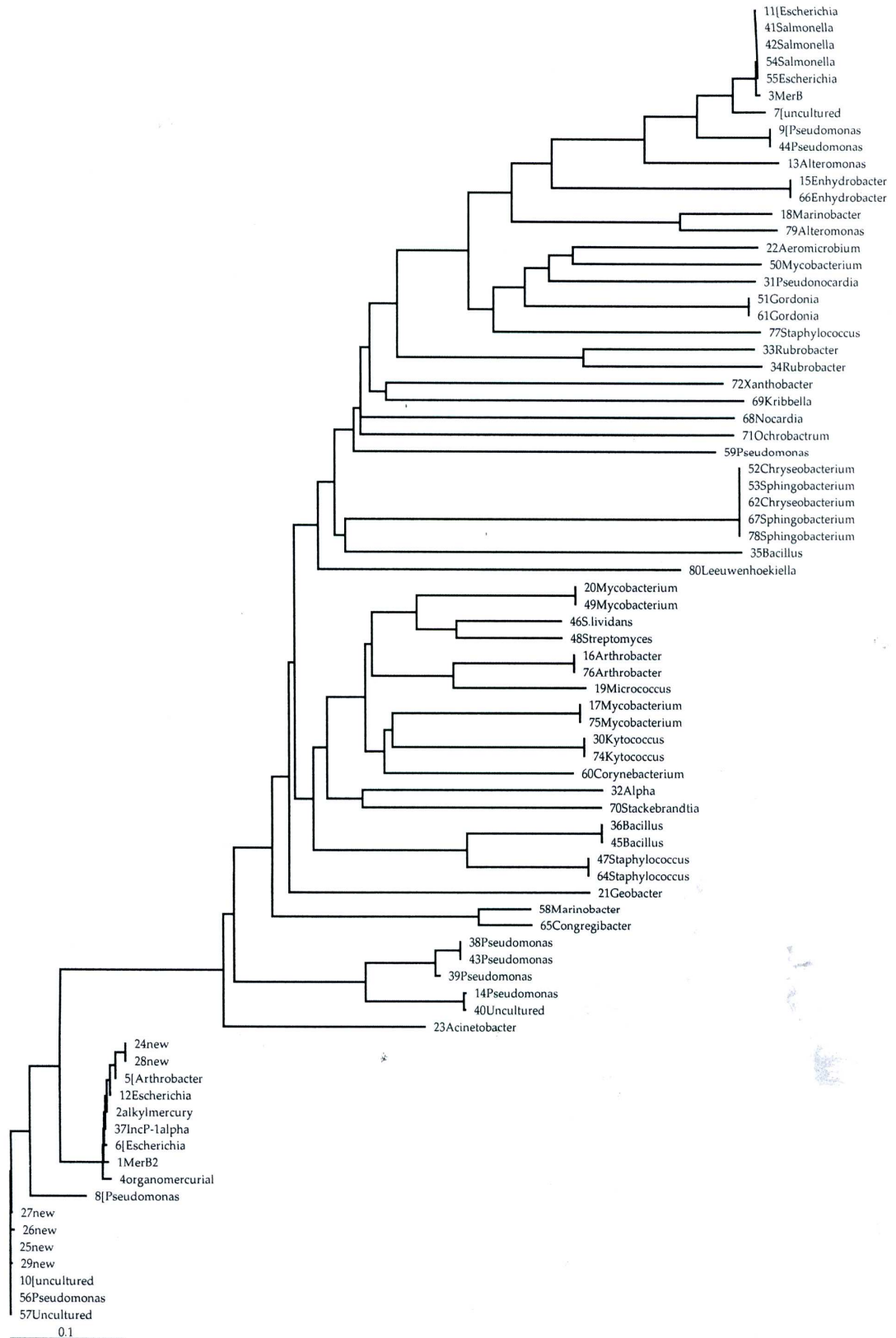


Figura 4.1. Árvore filogenética do gene *merB*. Árvore neighbor-joining construída foi construída utilizando-se 80 sequências do gene *merB* de amostras ambientais referênciadas no Genbank.

O programa online *Primer3* Input (version 0.4.0) (Whitehead Institute of Biomedical Research) foi utilizado para o desenho dos primers e as regiões escolhidas para o desenho do primer *forward* e *reverse* foram aquelas onde haviam regiões conservadas para todos os isolados do agrupamento escolhido. Para o desenho dos primers degenerados, utilizou-se o alfabeto de nucleotídeos degenerados, onde: E = G ou T ou C; D = G ou A ou T; H = A ou T ou C; K = G ou T; M = A ou C; N = A ou C ou G ou T; R = A ou G; S = G ou C; V = A ou C ou G; W = A ou T; X = C ou I; Y = C ou T. Este procedimento foi realizado pois o uso de oligonucleotídeos degenerados pode aumentar as chances de amplificação do gene de interesse. Para otimização da reação de PCR dos novos primers foram utilizadas as concentrações e os ciclos descritos anteriormente. Os resultados obtidos da reação de PCR foram expressos como positivo (+) quando observou-se presença de bandas no gel de agarose, e como negativo (-) quando houve ausência de bandas no gel de agarose.

Nos experimentos para a detecção da presença de CH₄ e CO₂ na transformação de metilmercúrio à Hg⁰ por *P. putida* V1 utilizou-se o meio LB (15mL). Posteriormente esse meio LB foi inoculado com uma alíquota do pré-inóculo de *P. putida* V1 como descrito no item anterior. Paralelamente, controles com células inativadas de *P. putida* V1 foram preparados. Os controles de células inativadas foram obtidos com o aquecimento dos frascos em banho-maria à 80°C/ 30 à 40 min após a inoculação. Em seguida adicionou-se 100 µL da solução estoque de ¹⁴CH₃Hg radioisótopo, que correspondeu à 102166,7 e 102270,1 dpm, quando mensurado em Scintillator Counter. Posteriormente, os frascos inoculados e contendo a solução de radioisótopo foram incubados por 4 e 8 h à 29 ± 2 °C sob agitação de 100 rpm. Após cada período de incubação, adicionou-se 6 mL de NaOH (6N) para inativar a *P. putida* da amostra e paralisar a reação. Também foi adicionado o mesmo volume de NaOH (6N) nos controles com células inativadas. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração (-20 °C) por uma noite, seguindo-se estabilização da temperatura ambiente por 1 a 2 h no dia posterior antes do início dos experimentos de captura do ¹⁴CH₄. As soluções armadilhas foram preparadas em tubos de ensaio do Scintillation que

continham a mistura 6 mL da solução Scinti Verse cocktail (Fisher Cat.No.: SX 1-4: special cocktail), 3 mL de metanol e 3 mL 2- Feniletilamina. Após homogeneização, os tubos contendo as amostras foram dispostos ao lado de sua respectiva armadilha, seguindo-se da conexão amostra-armadilha utilizando-se tubos com seringas acopladas em cada extremidade. Para este procedimento utilizou-se forno de aquecimento (800 °C), primeiramente colocando-se agulhas novas em cada seringa, com posterior conexão do tubo à armadilha e depois à amostra. Esta amostra foi introduzida lentamente para evitar a perda de $^{14}\text{CH}_4$. As amostras foram submetidas à borbulhamento com gás comprimido, por meio da conexão de uma seringa às amostras por meio de uma nova agulha. O ar comprimido foi injetado a uma pressão de 15-20 mL/min e as amostras permaneceram em borbulhamento por um período de 40 minutos, para que todo o gás $^{14}\text{CH}_4$ passasse pelo o forno de aquecimento e fosse capturado pela armadilha. Após esse período, os tubos de ensaio do Scintillation foram levados ao equipamento Scintillation Counter para quantificar a dpm presente na solução armadilha. Após realizar o mesmo procedimento para todas as amostras, 1 mL de HCL (6N) foi adicionado a cada tubo contendo as diferentes amostras para liberar o CO_2 para solução. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração (-20 °C) por uma noite, seguindo-se estabilização da temperatura ambiente por 1 a 2 h no dia posterior antes do início dos experimentos de captura do $^{14}\text{CO}_2$. Para a realização deste experimento não é necessário o uso do forno de aquecimento e as soluções armadilhas foram preparadas conforme descrito anteriormente para o gás $^{14}\text{CH}_4$. Após estabilização da temperatura ambiente por 1 a 2 h, agulhas novas foram colocadas em cada seringa e cada tubo foi conectado primeiramente à armadilha e posteriormente à amostra. As amostras foram introduzidas lentamente para evitar a perda de $^{14}\text{CO}_2$. Para o borbulhamento das amostras, outros tubos que também possuem seringa na extremidade foram conectados às amostras por meio de uma nova agulha. O ar comprimido foi injetado com fluxo próximo à 15-20 ml/min. As amostras permaneceram em borbulhamento na presença de gás comprimido por um período de 40 minutos de maneira que todo o gás $^{14}\text{CO}_2$ fosse capturado pela armadilha. Após esse período os tubos de ensaio do Scintillation foram

levados ao equipamento Scintillation Counter para quantificação da dpm presente na solução armadilha. Os resultados obtidos no Scintillation Counter foram expressos em dpm (desintegração por minuto, ou atividade da amostra em unidades de decaimentos nucleares por minuto) (Anexo II) e foram utilizados para calcular a presença de $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$ nos frascos da solução armadilha. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Os experimentos foram realizados em triplicata e as médias e desvio padrão ($N-1$) foram calculados. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de média Tukey ($p < 0.05$) usando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Capítulo II foi reportado a capacidade de *P. putida* V1 isolada de solos de *landfarming* com despejos de processos da indústria petroquímica do Rio Grande do Sul, em remover metilmercúrio sob condições variadas de pH, temperatura e concentrações de metilmercúrio e capacidade de resistir à outros metais pesados. No Capítulo III avaliou-se a capacidade de *P. putida* V1 de remover metilmercúrio em diferentes doses desse composto (baixa concentração = 2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$; concentração inibitória mínima = 11,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$; concentração biocida = 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Todavia, não foi determinado a influência do tempo de incubação sobre o percentual de remoção desse metilmercúrio. Esta abordagem é relevante do ponto de vista de aplicação prática da *P. putida* V1 em processos de bioremediação, já que devido às condições adversas dos sítios contaminados, pode ser desejável que a bactéria consiga remover o máximo do composto alvo no menor tempo possível.

Desta forma, no presente estudo avaliou-se a capacidade de crescimento e remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 em concentração conhecida (2,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e em intervalos de tempos diferentes: 4, 8, 12 e 24 horas (Figura 4.2). Os resultados indicaram que o crescimento celular de *P. putida* V1 foi estatisticamente diferente em todos os intervalos de tempo analisados quando a bactéria cresceu na presença ou ausência de metilmercúrio ($p < 0.05$). Apesar de *P. putida* V1 se multiplicar rapidamente na presença ou ausência de metilmercúrio nas primeiras 4 horas de incubação, quando o meio de cultura não continha metilmercúrio, foram observados os

maiores valores de densidade óptica em 4, 8, 12, 24 horas (1,2; 1,3; 1,6 unidades DO_{600nm} , respectivamente).

Quando foi determinada a capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1, observou-se que após 4 hs de incubação essa bactéria foi capaz de remover 67% do metilmercúrio adicionado ao caldo LB. O percentual de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1 foi de 69% em 8 horas, 71% em 12 horas e 75% em 24 horas de incubação, indicando que a extensão da incubação por um período maior que 4h não leva a um aumento significativo da quantidade de metilmercúrio removido do meio de cultura.

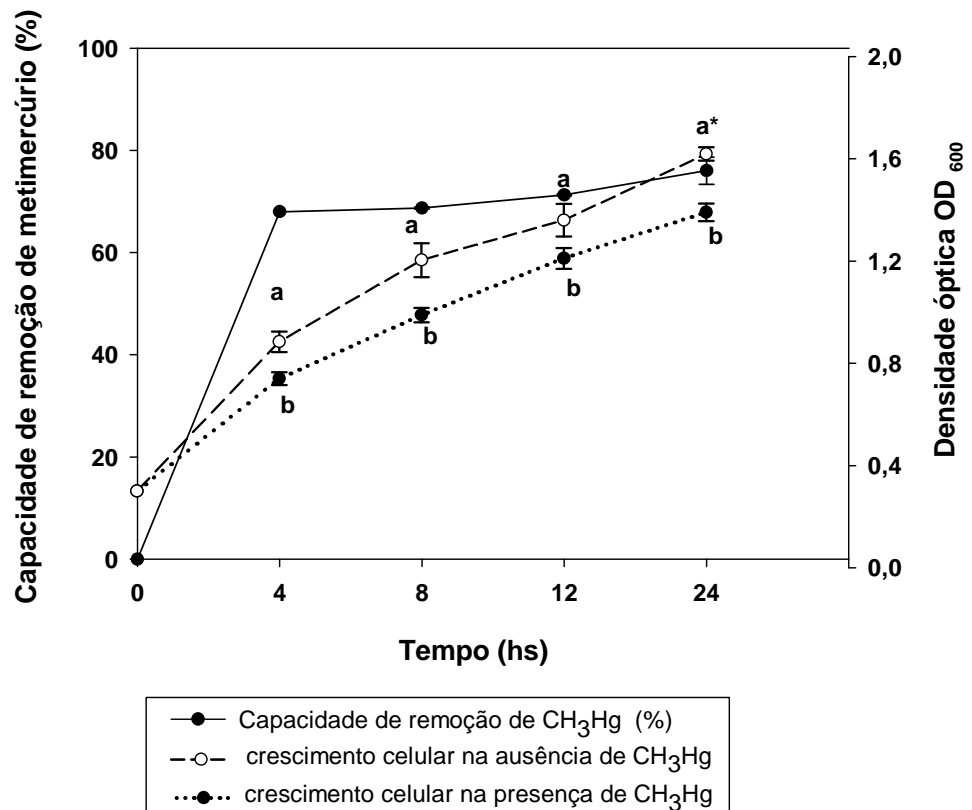


Figura 4.2. Capacidade de remoção de metilmercúrio (%) (●) e crescimento celular na presença (●) e ausência (○) de metilmercúrio por *P. putida* V1 em caldo LB em $2,3 \mu mol L^{-1}$ de metilmercúrio. Cada ponto representa a média das triplicatas e as barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t ($p < 0.05$).

Estes resultados são promissores do ponto de vista de bioremediação, já que a eficiência da *P. putida* V1 em remover o metilmercúrio parece não estar associada a necessidade de multiplicação de uma população elevada. Um resultado similar foi encontrado por Giovanella et al. (2011), que observaram um rápido crescimento de *Proteus mirabilis* (M50C) na presença e ausência de HgCl_2 após 4 horas de incubação e uma remoção de 72% do mercúrio presente no caldo LB.

Os resultados apresentados nos dois últimos capítulos também sugerem *P. putida* V1 como um recurso microbiano com potencial para degradar o metilmercúrio em ambientes contaminados. Todavia, sabe-se que ambientes nos quais resíduos são depositados ou que sofreram algum desastre ambiental, são normalmente contaminados com outros compostos tóxicos. No caso do mercúrio, diversas formas contendo este metal pesado podem estar presentes num ambiente contaminado (Nevado et al., 2010; Nakamura et al., 1990). Assim, de maneira a fornecer todos os subsídios necessários sobre o comportamento da *P. putida* V1 anteriormente à realização de experimentos de bioremediação em escala piloto (microcosmos, biorreatores e experimentos com solo em casa de vegetação), é necessária a investigação do potencial da *P. putida* V1 em remover diversas formas de mercúrio em condições *in vitro*.

Nas Figuras 4.3-4.5 são apresentados os resultados dos experimentos para avaliação do crescimento celular e da remoção de mercúrio por *P. putida* V1 em caldo LB na presença de diferentes compostos de mercúrio (cloreto de mercúrio, acetato de fenilmercúrio e timerosa). O crescimento celular de *P. putida* V1 no tratamento controle resultou nos maiores valores de absorvância quando comparados aos demais tratamentos contendo os compostos de mercúrio (1,3 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$) ($p < 0,05$). Todavia, quando adicionou-se $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cloreto de mercúrio ao caldo LB, observou-se um crescimento celular significativamente maior do que o controle (1,4 unidades $\text{DO}_{600\text{nm}}$). Na presença de 100 e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de timerosal e acetato de fenilmercúrio, observou-se uma diminuição no crescimento de *P. putida* V1 em caldo LB para todos os compostos avaliados,

sendo que as leituras de densidade óptica variaram entre 1,1 e 1,3 unidades DO_{600nm}). O crescimento celular de *P.putida* V1 foi significativamente reduzido na presença de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de timerosal e acetato de fenilmercúrio (0,1 e 0,2 unidades DO_{600nm} , respectivamente), enquanto que em caldo LB contendo $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cloreto de mercúrio, não foi observada redução significativa do crescimento desta bactéria (1,1 unidades DO_{600nm}).

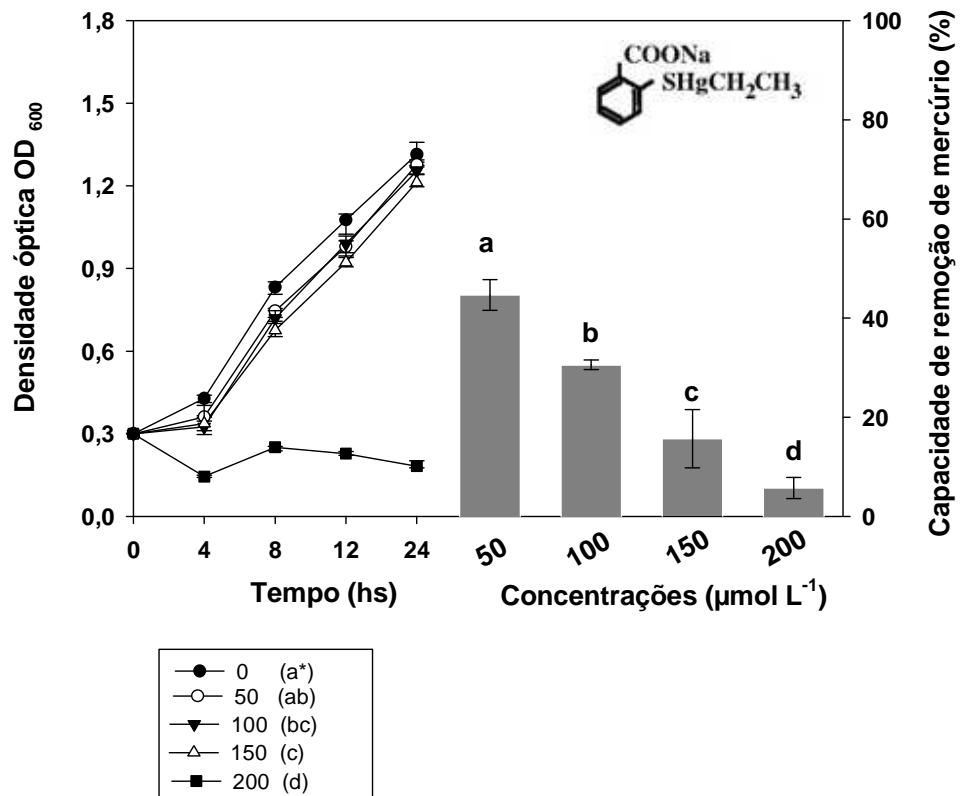


Figura 4.3. Capacidade de remoção de mercúrio (%) e o crescimento celular em diferentes concentrações de timerosal por *P. putida* V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à $29 \text{ }^\circ\text{C}$. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Foi observada uma redução significativa da capacidade de remoção deste metal por *P. putida* V1 quando testou-se os diferentes compostos de mercúrio e avaliou-se o efeito do aumento das concentrações ($p < 0,05$). Os mais altos percentuais de remoção de mercúrio por *P. putida* V1 foram observados em meio LB, contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acetato de

fenilmercúrio (62%). Os menores percentuais de remoção de mercúrio foram observados quando caldo LB continha $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de timerosal, acetato de fenilmercúrio e cloreto de mercúrio (5,7; 5,8 e 5,3%, respectivamente). Quando testou-se a capacidade de remoção de mercúrio por *P. putida V1* em diferentes concentrações de timerosal, o mais alto percentual de remoção de mercúrio por *P. putida V1* foi observado em caldo LB contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (44,67%). Quando o caldo LB continha 100 e $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de timerosal, observou-se um declínio significativo dos percentuais médios de remoção de mercúrio por *P. putida V1* (30,5 e 15, 71%, respectivamente).

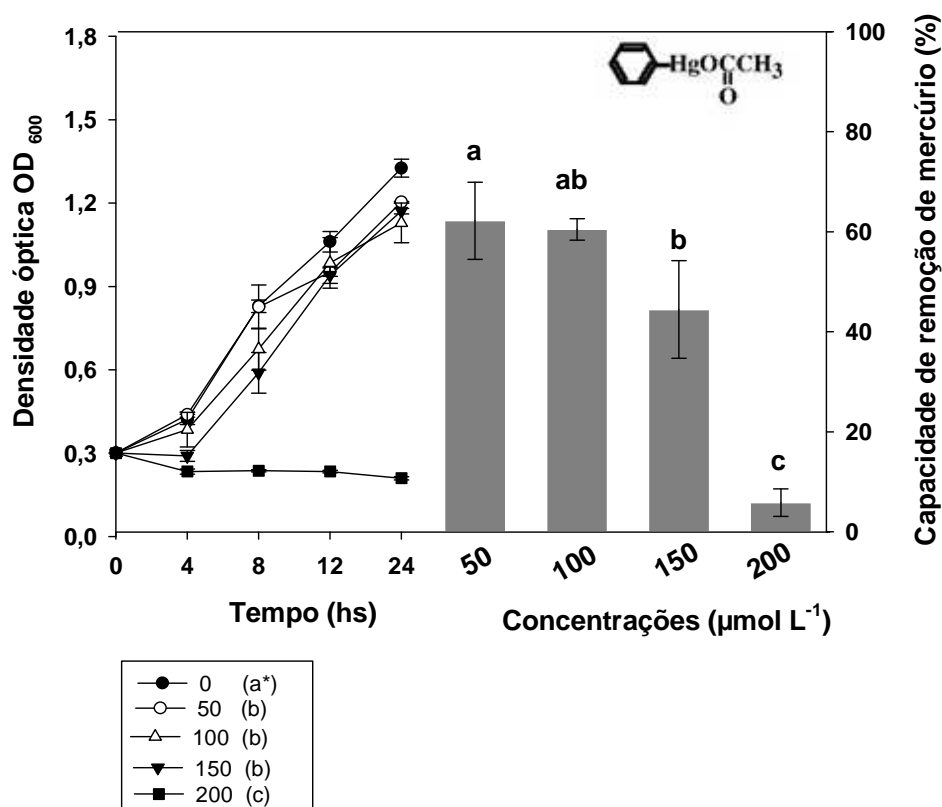


Figura 4.4. Capacidade de remoção de mercúrio (%) e o crescimento celular em diferentes concentrações de acetato fenilmercúrio por *P. putida V1* resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à $29 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Barras de erros representam o desvio padrão o da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

A remoção de mercúrio por *P. putida V1* em caldo LB contendo 50 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de acetato de fenilmercúrio foi de 62 e 60%, respectivamente

($p < 0,05$). Enquanto que em $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fenilmercúrio observou-se uma redução significativa na capacidade média de remoção de mercúrio por *P. putida* V1 (44%). Quando o caldo LB continha cloreto de mercúrio, observou-se as mais baixas capacidade média de remoção de mercúrio por *P. putida* V1 dentre os compostos testados. A remoção de mercúrio por *P. putida* V1 em caldo LB contendo $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi 34.2%. Na presença de 150 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cloreto de mercúrio observou-se um declínio significativo nos percentuais de remoção de mercúrio por *P. putida* V1, (13,1 e 7,3 e 13,1 %, respectivamente), não havendo diferença estatística.

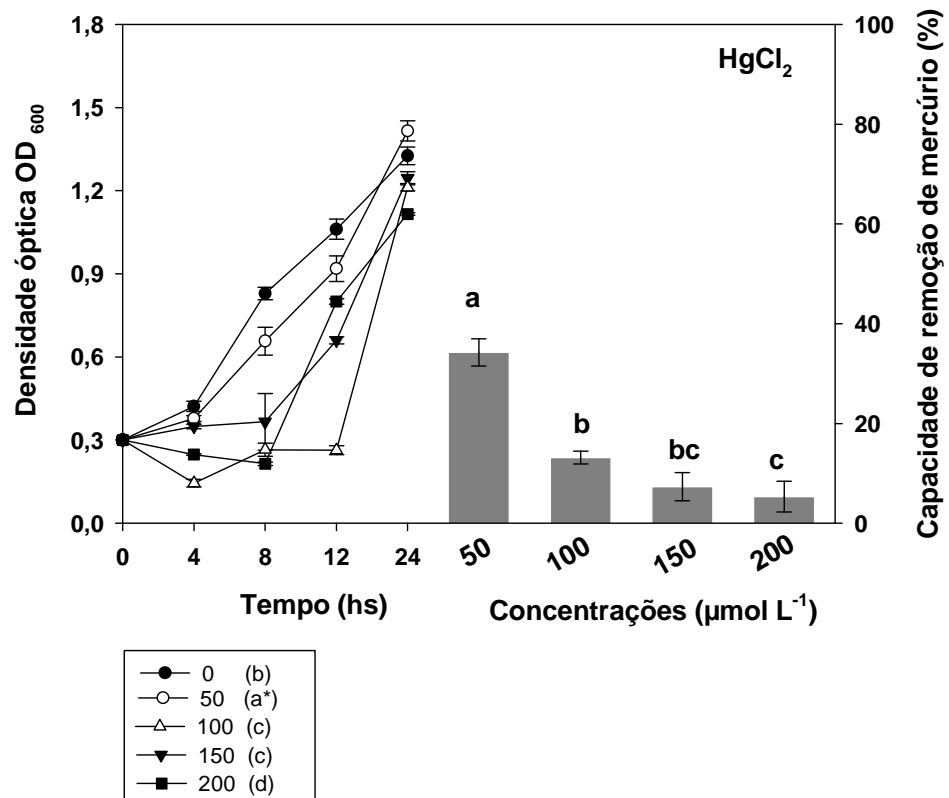


Figura 4.5. Capacidade de remoção de mercúrio (%) e o crescimento celular em diferentes concentrações de cloreto de mercúrio por *P. putida* V1 resistente à metilmercúrio após 24 horas de incubação à 29 °C. Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Os resultados dos testes de capacidade de crescimento celular de *P. putida* V1 na presença de timerosal, fenilmercúrio e cloreto de mercúrio,

indicaram que apesar das menores concentrações destes compostos (50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) terem ocasionado uma diminuição no crescimento celular de *P. putida* V1, após 24 horas de incubação o micro-organismo atingiu um crescimento expressivo. Observou-se também que este crescimento após 24 horas de incubação, não refletiu em altos percentuais de remoção de mercúrio (Figuras 4.3-4.5). Além disso, os resultados do presente estudo indicaram que os maiores percentuais de remoção de mercúrio foram relacionados aos compostos orgânicos, como timerosal e acetato de fenilmercúrio. Esses resultados corroboram os obtidos por Chien et al. (2010) que reportaram que a maioria das bactérias estudadas foram capazes de remover entre 50 à 90% da quantidade de compostos orgânicos de mercúrio adicionados ao meio LB.

Apesar dos compostos inorgânicos de mercúrio serem os mais encontrados em ambientes contaminados, os compostos orgânicos são os mais importantes sob o ponto de vista toxicológico (metilmercúrio, timerosal, acetato de fenilmercúrio). Sendo assim ao estudar o potencial microbiano para utilização de processos de biorremediação, busca-se encontrar micro-organismos que removam esses compostos. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam que o isolado *P. putida* V1 é capaz de remover diferentes compostos de mercúrio presentes no meio de cultura em diferentes formas, o que se constitui em característica de grande relevância para aplicação prática desta bactéria em processos de bioremediação.

Além do conhecimento do comportamento de *P. putida* V1 na presença de diferentes compostos de mercúrio, o estudo dos mecanismos envolvidos na transformação do mercúrio por esta bactéria pode fornecer informações importantes para um melhor aproveitamento do potencial de *P. putida* V1. O conhecimento do mecanismo de resistência envolvido na transformação de metilmercúrio por *P. putida* V1 teve como primeira etapa a determinação da presença de Hg^0 . De acordo com Barkay et al. (2003), quando um micro-organismo resistente a mercúrio apresentar uma produção de Hg^0 volátil (Hg^0), sugere-se que este micro-organismo possua o sistema operon *mer* como mecanismo de resistência. Assim, baseando-se em resultados anteriores que indicaram que *P. putida* V1 foi capaz de remover

um alto percentual de metilmercúrio nas 4-8 horas de incubação, estes tempos foram selecionados para realização dos experimentos.

Na figura 4.6 são mostrados os resultados da quantificação de Hg^0 decorrente da transformação de metilmercúrio ($0,008 \mu\text{mol L}^{-1}$) em meio LB inoculado com *P. putida* V1.

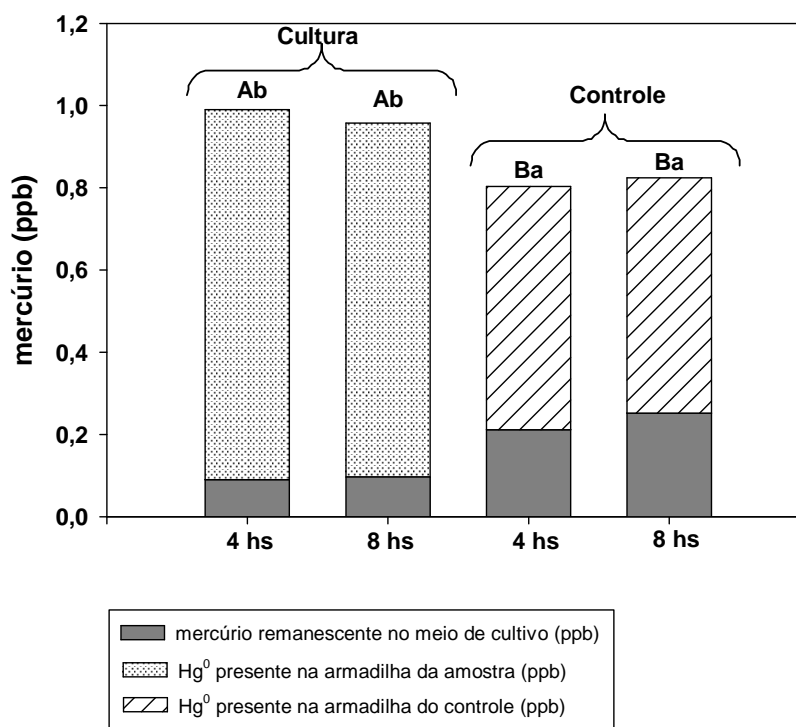


Figura 4.6. Determinação da presença de mercúrio volátil (ppb) por *P. putida* V1 resistente à metilmercúrio após 4 e 8 horas de incubação à 29 °C (▤) cultura e (▨) controle. Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t ($p < 0,05$). Mercúrio remanescente (■) no meio de cultivo (ppb) em caldo LB inoculado com *P. putida* após 4 e 8 horas de incubação à 29 °C. Médias seguidas de diferentes letras minúsculas indicam diferença estatística para cada metal pelo teste t ($p < 0,05$).

Observou-se diferença estatística entre os valores detectados de mercúrio volátil (Hg^0) tanto para o meio inoculado com *P. putida* V1 como para o controle ($p < 0,05$). A formação de mercúrio volátil (Hg^0) foi observada nas armadilhas (que continha solução para reter o Hg^0) conectadas aos frascos inoculados com *P. putida* V1, onde foram detectados os maiores valores de

mercúrio (0,9 e 0,8 ppb de mercúrio), em 4 e 8 horas, respectivamente. Os frascos contendo meio LB inoculado com *P. putida* V1 apresentaram 0,09 e 0,1 ppb de mercúrio remanescente, em 4 e 8 horas respectivamente. Nestes experimentos também observou-se, em menor proporção, a formação de mercúrio volátil (Hg^0) nas armadilhas (que continha solução para reter o Hg^0) conectadas aos frascos controles. Nestas armadilhas foram detectados valores entre 0,59 e 0,57 ppb de mercúrio após 4 e 8 horas, respectivamente. Os frascos contendo meio LB do controle (células inativas de *P. putida* V1) apresentaram 0,59 ppb e 0,57 ppb de mercúrio remanescente, em 4 e 8 horas respectivamente. Os valores de mercúrio remanescente observados no tratamento controle indicam que as células inativas de *P. putida* V1 não foram capazes de transformar esse composto, sendo utilizado como branco da análise.

Em relação à detecção de Hg^0 nos controles, uma possível explicação seria que o mercúrio sofre uma emissão natural para o ambiente. Considera-se que a redução de Hg^{+2} para Hg^0 ocorre naturalmente em águas e solos (Schlüter, 2000; Carpi e Lindberg, 1997; Nriagu, 1994). Esta perda natural ocorre devido à baixa solubilidade aquosa do mercúrio ($60\mu g L^{-1}$ em água) e de sua elevada capacidade de volatilização, o que resulta na emissão Hg^0 para o ar. Outra possibilidade para explicar a presença de mercúrio no controle estaria relacionada com a temperatura de incubação, pois mesmo à temperatura ambiente (por exemplo: $30\text{ }^\circ C$) o mercúrio pode volatilizar. Sendo assim, a temperatura de incubação do presente estudo ($29\text{ }^\circ C$) poderia induzir uma volatilização natural do meio de cultivo. Os baixos valores de mercúrio remanescente encontrados no meio de cultivo inoculado com *P. putida* V1 indicam que essa bactéria foi capaz de transformar esse composto, o que indica a presença de um mecanismo de redução enzimática. Normalmente, o mecanismo envolvido é o do *mer* operon, através do qual o mercúrio que se encontra na forma metilada (CH_3Hg) é degradada pela enzima organomercurio liase, ativada pelo gene *merB* até Hg^{+2} . Na sequência, a enzima mercúrio redutase, regulada pelo gene *merA*, transforma o Hg^{+2} a Hg^0 .

Devido à capacidade de *P. putida* V1 em emitir mercúrio volátil Hg^0 na remoção de metilmercúrio do meio de cultivo, avaliou-se a presença da enzima organomercurio liase (gene *merB*), relacionada ao sistema *mer* operon. Apesar disso, a atividade da enzima organomercurio liase de *P. putida* V1 não foi detectada (anexo II). Este resultado sugere que *P. putida* V1 não possua o aparato metabólico relacionado a enzima organomercurio liase (gene *merB*) ou que sua expressão tenha sido inibida por algum componente presente no meio de cultura. Para testar tais hipóteses, foram realizadas reações de PCR para detecção do gene *merB*. Apesar de *P. putida* V1, possuir o gene *merA* (Tabela 4.2), o gene *merB* não foi detectado após diversas tentativas e primers avaliados (Tabela 4.3).

Após a amplificação do gene *merA* de *P. putida* V1 por PCR, os produtos obtidos dessa reação foram sequenciados e os resultados indicaram que a sequência do *merA* de *P. putida* V1 possui alta similaridade com a sequência de micro-organismos que possuem o gene da mercurio reductase. A não detecção do gene *merB* de *P. putida* V1 com os primers apresentados na Tabela 4.1, levou ao desenho de novos conjuntos de primers a partir de sequências de bactérias obtidas de amostras ambientais (Tabela 4.3). No momento em que os primers foram desenhados, havia um total de 80 sequências de *merB* com alta similaridade no genbank (Figura 4.1). Apesar dos novos primers desenhados para o *merB* (tabela 4.3), o gene *merB* não foi detectado.

Tabela 4.2. Identificação da cepa bacteriana *P. putida* V1 baseado no sequenciamento do gene *merA*.

Número de nucleotídeos	Pesquisa Genbank	Similaridade (%) (gene <i>merA</i>)
410	X98999.3	<i>Pseudomonas</i> sp. transposon Tn5041 DNA (100%)
	Y17691.1	<i>Xanthomonas campestris</i> Tn5044 transposon (100%)
	HM217134.1	<i>Pseudomonas putida</i> strain SP1 MerR, MerT, MerP, MerC, and MerA genes, complete cds; and unknown gene (100%)
	Y18360.1	<i>Pseudomonas</i> sp. strain LS46-6, transposon Tn5046 (99%)
	EU259723.1	Uncultured organism clone Fw4P2d MerA (<i>merA</i>) gene, partial cds (99%)
	FJ639661.1	Uncultured organism clone Fw4P2c mercuric reductase (<i>merA</i>) gene, partial cds (99%)
	JN674168.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Pp1-FB1 mercuric ion reductase enzyme (<i>merA</i>) gene, partial cds (96%)

Tabela 4.3. Novos primers desenhados para esse trabalho a partir das sequências de amostras ambientais para o *merB* presentes no genbank.

Primer	Sequência (5'- 3')	Conteúdo de CG (%)	Tm (50 mM NaCl)
merB1F	GGCCACCAGTACCGAATATG	55	55.4 °C
merB1R	GCAGGTTTCGACAGCCTGTAT	55	57.3 °C
merB2F	ATGGGAACATCATCGGCTAC	50	54.7 °C
merB2R	GTATCTCGCTGGGTGAAACC	55	55.6 °C

Tabela 4.3. Continuação...

merB3F	GCTCGSCRSCGCACTCGGAT	72,5	66,6 °C
merB3R	TTTCRCGTAGYGTCAGSCCCA	57	61,3 °C
merB4F	CSCGCTACTGSGKGA ACT	63,8	58,9 °C
merB4R	TACTGGTGGCYTGTTCGAGYA	52,3	58,2 °C

Como última alternativa para detectar o *merB*, avaliou-se a presença de $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$ na transformação de metilmercúrio à Hg^0 por *P. putida* V1. Sabe-se que quando os organomercuriais são clivados a mercúrio inorgânico (Hg^{+2}) pela organomercurio liase, os produtos da clivagem geram outros compostos, tais como o metano (CH_4) e uma pequena quantidade de CO_2 a partir de metilmercúrio (Silver & Phung, 1996; Barkay et al., 2003). Para a avaliação da possível formação de CH_4 e CO_2 utilizou-se a técnica de radioisótopos marcados, nesse caso $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$. Os resultados da avaliação de $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$ após 4 e 8 horas de incubação à 29°C, são apresentados na Figura 4.7. Pode-se observar que no controle não houve emissão de $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$ em 4 e 8 horas de incubação (0%), respectivamente. Todavia, nas amostras onde *P. putida* V1 foi inoculada, observou-se emissões de $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$. O maior percentual de emissão de $^{14}\text{CH}_4$ foi observado para a cultura de *P. putida* V1 em 8 horas de incubação (51,1%), ao contrário da emissão de $^{14}\text{CH}_4$ em 4 horas de incubação, que foi nula (0%). Por outro lado, os percentuais de emissão de $^{14}\text{CO}_2$ da cultura de *P. putida* V1 em 4 e 8 horas de incubação apresentaram-se muito similares (19,8 e 21%, respectivamente) ($p < 0,05$).

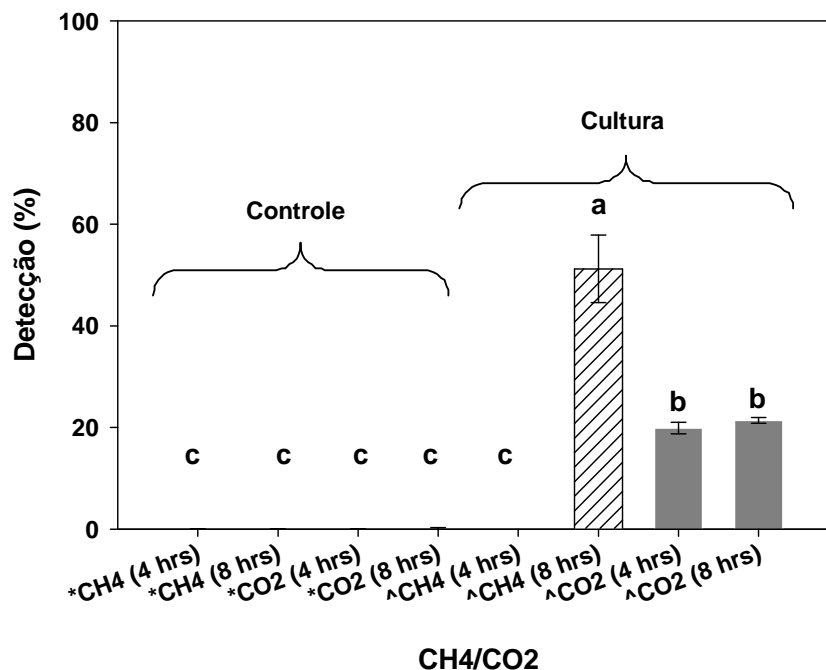




Figura 4.7. Determinação da presença de $^{14}\text{CH}_4$ () e $^{14}\text{CO}_2$ () liberado por *P. putida* V1 resistente à metilmercúrio pela adição de $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}$ em caldo LB após 4 e 8 horas de incubação à 29 °C . Barras de erros representam o desvio padrão da média. Médias seguidas de diferentes letras indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Os altos percentuais de emissão de $^{14}\text{CH}_4$ poderiam confirmar a presença do gene *merB* em *P. putida* V1, já que a formação deste composto está relacionada com a expressão de enzimas degradativas do metilmercúrio (CH_3Hg) codificadas pelo sistema de detoxificação *mer* operon (Hines et al., 2006). Todavia, os percentuais de emissão de $^{14}\text{CO}_2$ por esta bactéria (19,8 e 21%) e quando o *mer* operon é sistema de detoxificação envolvido na transformação do metilmercúrio, foram bem maiores do que os relatados na literatura, (Barkay e Wagner-Döbler, 2005). Um aspecto importante a ser considerado é que os principais estudos feitos para detectar a presença de $^{14}\text{CH}_4/^{14}\text{CO}_2$ foram realizados com bactérias anaeróbias e em amostras de sedimentos. Não foram encontrados estudos com bactérias aeróbias, havendo deficiência de informações para diagnosticar se realmente um novo mecanismo estaria relacionado à transformação de metilmercúrio por *P. putida* V1.

Os resultados indicam também que pode haver diversidade genética e catabólica ainda não descritas para os mecanismos de remoção de metilmercúrio, sugerindo que *P. putida* V1 possivelmente possua outro mecanismo de transformação do mercúrio que não envolva o gene *merB*. Este fato é baseado na não detecção da enzima organomercurio liase por ensaios enzimáticos, ausência do gene *merB* e pela alta emissão de CO₂, o que é incomum ao operon *mer*. A identificação de novos mecanismos eficientes na remoção de contaminantes tóxicos é de grande relevância para fins de biorremediação, pois aumentariam as chances de desenvolver técnicas mais eficientes baseando-se no controle ou otimização das condições que afetam o metabolismo bacteriano. Trabalhos adicionais, que aprofundem no conhecimento do metabolismo de *P. putida* V1 devem ser realizados para elucidar a existência de um novo mecanismo de transformação de metilmercúrio desta bactéria.

5.4 CONCLUSÕES

A remoção de mercúrio do caldo LB por *P. putida* V1 foi influenciada pelo tipo de composto de mercúrio adicionado a este meio. A maior remoção de mercúrio do meio de cultura ocorreu quando o composto de mercúrio adicionado foi o acetato de fenilmercúrio. Já quando o cloreto de mercúrio foi o composto adicionado ao caldo LB, a remoção de mercúrio por *P. putida* V1 foi reduzida. As reações de PCR indicaram que o gene *merA* está presente no DNA de *P. putida* V1. Os resultados revelaram que este gene possui alta similaridade (100%) com o gene da mercúrio redutase de outros micro-organismos como, *Pseudomonas* sp. e *P. putida*. Já a atividade da enzima organomercurio liase e o gene *merB* não foram detectados na cepa *P. putida* V1. A expressão de $^{14}\text{CO}_2$ por *P. putida* V1 sugere que o mecanismo de remoção de mercúrio por *P. putida* V1 possa não estar associado ao operon *mer*. Desta forma, sugere-se que *P. putida* V1 apresente um novo mecanismo de resistência a mercúrio orgânico, ainda não descrito na literatura. Sendo assim, estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de se confirmar esta hipótese, e de, então, elucidar o mecanismo de remoção de mercúrio por *P. putida* V1.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTISM NEWS STAFF. **Autismcauses:** vaccines with mercury/thimerosal linked to autism. 2008. Disponível em: <<http://www.not-autism.org/autism-causes-vaccines-with-mercury-thimerosal-linkedto-autism.php>> Acesso em: 25 fev. 2012

BALL, M. M.; CARRERO, P.; CASTRO, P. C. Mercury resistance strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). **Current Microbiology**, New York, v.54, n.2, p.149–154, 2007.

BARKAY, T.; B. H. OLSON. Phenotypic and genotypic adaptation of aerobic heterotrophic sediment bacterial communities to mercury stress. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.2, p.403-406, 1986.

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

BENNETT, S. (Autism Coach). **Autism declines when mercury vaccines banned.** Autism mercury. Disponível em: <<http://www.autismcoach.com/Autism Declines When Mercury Vaccines Banned.htm>> Acesso em: 25 fev. 2012

BEAULIEU, H.J.; BEAULIEU, S.; BROWN, C. Phenyl mercuric acetate (PMA): mercury-bearing flexible gymnasium floors in schools--evaluation of hazards and controlled abatement. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, Virginia, v.5, n.6, p.360-366, 2008.

BOENING, D. W. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, Amsterdam, v.40, n.12, p.1335-51, 2000.

BUDHATHOKI, D. et al. Administration of Thimerosal to Infant Rats Increases Overflow of Glutamate and Aspartate in the Prefrontal Cortex: Protective Role of Dehydroepiandrosterone Sulfate. **Neurochemical Research**, New York, v.37, n.2, p.436-447, 2011.

CABRAL, L., GIOVANELLA, P. GIANELLO, C., BENTO, F.M.B, ANDREAZZA, R, CAMARGO, F.A.O Isolation and characterization of methylmercury resistant bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* strain **Biodegradation** New York (submetido, 2012)

CARPI, A.; LINDBERG, S.E. Sunlight-mediated emission of elemental mercury from soil amended with municipal sewage. **Science of the Total Environment**, Amsterdam v.31, n.7, p.2085-2091, 1997.

CHADHAIN, S.M. N. et al. Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. **Environmental Microbiology**, Hoboken , v.8, n.10, p.1746-1742, 2006.

CHATZIEFTHIMOU, A. et al. T. The isolation and initial characterization of mercury resistant chemolithotropic thermophilic bacteria from mercury rich geothermal springs. **Extremophiles**, New York, v.11, n.3, p.469-479, 2007.

CHOI, S.C.; CASE, T.; BARTHA, R. Enzymatic catalysis of mercury methylation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.4, p.1342-1346, 1994.

GIOVANELLA, P. et al. Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio. **Química Nova**, São Paulo, v.34, n.2, p.232-236, 2011.

GRIFFIN, H.G.; et al. Cloning and DNA sequence of the mercuric- and organomercurial-resistance determinants of plasmid pDU1358. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n.10, p. 3112-3116, 1987.

HENRIETTE, C.; PETITDEMANGE, E.; RAVAL, G. 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**, London, v.71, n.5, p.439-444, 1991.

HINTELMANN, H.; KEPPEL-JONES, K.; EVANS, R.D. Constants of mercury methylation and demethylation rates in sediments and comparison of tracer and ambient mercury availability. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Hoboken v.19, n.9, p. 2204–2211, 2000.

KIENE, R.P. et al. Metabolism of Reduced Methylated Sulfur Compounds in Anaerobic Sediments and by a Pure Culture of an Estuarine Methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.5, 1986.

MARTINS, A.S. et al. A conservative region of the mercuric reductase gene (merA) as a molecular marker of bacterial mercury resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.39, n.2, p.307-310, 2008.

MARVIN-DIPASQUALE, M. et al. Methyl-Mercury Degradation Pathways: a comparison among three mercury-impacted ecosystems **Science of the Total Environment**, Amsterdam v. 34, p. 4908-4916, 2000.

MASON, R.; FITZGERALD, W. The global mercury cycle: Oceanic and anthropogenic aspects. In: BAEYENS, W.; EBINGHAUS, R.; VASILIEV, O. (Eds.) **Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances**. Dordrecht: Kluwer Academic. 1996. p.85-108.

MAXSON, P. Global mercury production, use and trade. In: PIRRONE, N.; MAHAFFEY, K. (Ed). **Dynamics of mercury pollution on regional and global scales: atmospheric processes and human exposures around the world**. New York: Springer, 2005. p. 25-50.

NAKAMURA, K. et al. Removal of mercury from mercury-contaminated sediments using a combined method of chemical leaching and volatilization of mercury by bacteria. **Biodegradation**, New York, v.10, n.6, p.443–447, 1999.

NAKAMURA, K et al. Organomercurial-Volatilizing Bacteria in the Mercury-Polluted Sediment of Minamata Bay, Japan. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 56, n.1, p. 304-305, 1990.

NEVADO, J.J.B. et al. Mercury in the Tapajós River basin, Brazilian Amazon: a review. **Environment International**, Amsterdam, v.36, p. 593–608, 2010.

NRIAGU, J.O. Mechanistic steps in the photoreduction of mercury in natural waters. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.154, n.1, p. 1-8. 1994.

NARITA, M. et al. Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v.223, n.1, p. 73-82, 2003.

PAK, K.R.; BARTHA, R. Mercury Methylation and Demethylation in Anoxic Lake Sediments and by Strictly Anaerobic Bacteria 1998. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 3, p.1013-1017, 1998.

OREMLAND, R.; CULBERTSON, C.W.; WINFREY, M.R. Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures: Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 1, p. 130-137, 1991.

OREMLAND, R.; ZEHR, J. Formation of Methane and Carbon Dioxide from Dimethylselenide in Anoxic Sediments and by a Methanogenic Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, n.5, p. 1031–1036, 1986.

OSBORN, A. M. et al. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam v.19, n.4, p.239-262, 1997.

RENIERO, D.; GALLI, E.; BARBIERI, P. Cloning and comparison of mercury- and organomercurial resistance determinants from a *Pseudomonas stutzeri* plasmid. **Gene**, Amsterdam, v.166, v.1, p.77–82, 1995.

RENIERO, D. et al. Two aberrant mercury resistance transposons in the *Pseudomonas stutzeri* plasmid pPB. **Gene**, Amsterdam v.208, n.1, p.37–42, 1998.

SCHLÜTER, K. Review: evaporation of mercury from soils: an integration and synthesis of current knowledge. **Environmental Geology**, New York v.39, p.249-271, 2000.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **CERCLA: Priority list of hazardous substances**. Washington, DC, 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **SW-846, Method 7471B, Mercury in Solid or Semisolid Waste** (Manual Cold Vapor Technique). Washington, DC, 2007.

WANG, Y. et al. Environmental Conditions Constrain the Distribution and Diversity of Archaeal merA in Yellowstone National Park, Wyoming, U.S.A. **Microbial Ecology**, New York, v.62, n.4, p.739-752, 2011.

WIATROWSKI, H. A.; WARD, P.M., BARKAY, T. Novel Reduction of Mercury(II) by Mercury-Sensitive Dissimilatory Metal Reducing Bacteria. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.40, n.21, p. 6690-6696, 2006.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTING, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n.6, p.788-793, 1998.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolamento de micro-organismos resistentes à metilmercúrio para potencial aplicação em processos de biorremediação onde este poluente seja o principal contaminante foi o principal objetivo deste trabalho. Para isto, o presente trabalho foi dividido em três estudos com metas específicas: a) isolar bactérias resistentes ao metilmercúrio a partir de solos e lodo de esgoto coletados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e determinar a capacidade de remoção de metilmercúrio em diferentes temperaturas e valores de pH; b) avaliar a influência da presença de NaCl, presença de metais pesados, de sais e suas combinações em condições *in vitro* sobre a capacidade de remoção de metilmercúrio da cepa mais resistente a este composto (*P. putida* V1) e c) determinar o efeito de timerosal, acetato de fenilmercúrio e cloreto de mercúrio no comportamento e capacidade de remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1, e estudo do aparato metabólico e genético envolvido na transformação de metilmercúrio por esta bactéria em condições *in vitro*.

Micro-organismos de diferentes gêneros/espécies resistentes à metilmercúrio foram isolados a partir das amostras analisadas no presente estudo, como *Pseudomonas* sp, *Enterobacter* sp. e *Serratia* sp., *Bacillus cereus*, *Pseudomonas parafulva* e *Providencia alcalifaciens*. O isolado mais eficiente na remoção de metilmercúrio *in vitro* foi *P. putida* V1, isolada a partir das amostras de solo de *landfarming*. Esta bactéria é capaz de transformar eficientemente o metilmercúrio presente no meio de cultivo em uma ampla faixa de pH (4,0 a 8,0) e temperatura (10 a 35°C). Além disso, *P. putida* V1

resiste ao NaCl e alguns metais que podem estar presentes em ambientes contaminados. Apesar dos sais e metais pesados estudados influenciarem o crescimento e a remoção de metilmercúrio por *P. putida* V1, observou-se que a concentração de metilmercúrio é determinante para a sobrevivência da bactéria.

Dentre os principais genes envolvidos na transformação de mercúrio, *merA* mas não o *merB* foi identificado em *P. putida* V1. Além disso, a enzima organomercurio liase não foi detectada por ensaios enzimáticos e os testes com marcadores radioativos indicaram uma produção elevada de $^{14}\text{CO}_2$. Estes fatos sugerem que um mecanismo diferente dos descritos até o momento pode estar envolvido na transformação de metilmercúrio por *P. putida* V1. Estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de se determinar o mecanismo de remoção de mercúrio por *P. putida* V1 de maneira que sua aplicação em processos de bioremediação seja efetivamente aproveitada.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a microbiota capaz de resistir e transformar metilmercúrio à uma forma menos tóxica é restrita. Apesar disto, *P. putida* V1 parece ser um potencial candidato para biorremediação de metilmercúrio de ambientes contaminados. Contudo, estudos adicionais devem ser realizados com o intuito de se determinar o mecanismo de remoção de mercúrio por *P. putida* V1 de maneira que sua aplicação em processos de bioremediação seja efetivamente aproveitada. Além disso, para aplicações práticas, estudos que usem condições controladas, tais como microcosmos, biorreatores e casa de vegetação, são necessários para confirmar o potencial de remediação desta bactéria.

7. ANEXOS

Anexo I. Leituras de absorvância em diferentes: volume de amostra de extrato bruto celular de *P.putida* V1, concentrações e tempos (minutos).

1) Concentração de metilmercúrio do ensaio: 0,0125 $\mu\text{mol L}^{-1}$									
Volume de amostra (μl)									
Tempos (min)	50	Branco	AE (U)	100	Branco	AE (U)	200	Branco	AE (U)
0	541	601		586	585		619	576	
5	466	502		397	436		314	355	
10	396	421	< 0	266	312	< 0	142	187	< 0
15	325	342		159	204		71	94	
30	192	194		59	81		55	64	

2) Concentração de metilmercúrio do ensaio: 0,025 $\mu\text{mol L}^{-1}$									
Volume de amostra (μl)									
Tempos (min)	50	Branco	AE (U)	100	Branco	AE (U)	200	Branco	AE (U)
0	490	574		523	534		511	534	
5	471	507		380	399		291	300	
10	386	419	< 0	221	245	< 0	107	143	< 0
15	319	355		140	160		54	95	
30	227	252		68	87		55	71	

Anexo I. Continuação...

3) Concentração de metilmercúrio do ensaio: 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Volume de amostra (μl)

Tempos (min)	50	Branco	AE (U)	100	Branco	AE (U)	200	Branco	AE (U)
0	509	531		522	578		512	542	
5	433	455		371	460		296	335	
10	375	383	< 0	245	332	< 0	133	162	< 0
15	290	288		126	186		66	81	
30	187	224		80	119		70	94	

4) Concentração de metilmercúrio do ensaio: 12,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Volume de amostra (μl)

Tempos (min)	50	Branco	AE (U)	100	Branco	AE (U)	200	Branco	AE (U)
0	565	580		574	593		548	605	
5	474	482		405	417		290	353	
10	413	418	< 0	290	320	< 0	159	206	< 0
15	363	365		204	234		95	133	
30	311	311		146	148		81	100	

Anexo II: Resultados obtidos no Scintillation Counter expressos em dpm (desintegração por minuto, ou atividade da amostra em unidades de decaimentos nucleares por minuto) utilizados para calcular a presença de $^{14}\text{CH}_4$ e $^{14}\text{CO}_2$ nos frascos da solução armadilha

Amostras		Tempo	Médias de Leitura (dpm)
	Concentração inicial		6455.5
Controle	CH_4	4 horas	92.7
	CO_2		400.7
	Concentração inicial		6452.7
Controle	CH_4	8 horas	89.9
	CO_2		450.6
	Concentração inicial		3345.65
Cultura	CH_4	4 horas	62.74
	CO_2		9677.9
	Concentração inicial		3176.4
Cultura	CH_4	8 horas	35261.6
	CO_2		9875.1

8. RESUMO BIOGRÁFICO

Lucélia Cabral, filha de Laurides Barbosa Cabral e Pedra Goulart Cabral, nasceu em 20 de setembro de 1980, em Tubarão, Santa Catarina. Estudou no Colégio Estadual Imaculado Coração de Maria em Pedras Grandes, Santa Catarina onde completou o ensino fundamental. cursou ensino médio no Colégio Agrícola de Camboriú, obtendo o grau de Técnico Agrícola. Em 2000 ingressou no curso de Agronomia na Universidade do Estado de Santa Catarina, graduando-se como Engenheira Agrônoma em 2005. Em março de 2006 mudou-se para Lavras, Minas Gerais, onde iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras, obtendo o grau de mestre em fevereiro de 2008. Em março de 2008, iniciou o curso de Doutorado em Ciência do Solo no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No período de janeiro de 2011 a dezembro de 2011 realizou estágio no exterior (doutorado sanduíche) em Rutgers - The State University of New Jersey, sob a orientação da Professora Tamar Barkay.