Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

# *"Estudo do gene merA em bactérias gram-negativas resistentes ao mercúrio isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros: contribuição para a mitigação dos riscos do mercúrio à saúde humana através da biorremediação"*

*por*

*Sheila da Silva Duque*

*Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública.*

*Orientador principal: Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas*
*Segunda orientadora: Prof.ª Dr.ª Adriana Hamond Regua Mangia*

*Rio de Janeiro, março de 2012.*

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

*Esta tese, intitulada*

***"Estudo do gene merA em bactérias gram-negativas resistentes ao mercúrio isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros: contribuição para a mitigação dos riscos do mercúrio à saúde humana através da biorremediação"***

*apresentada por*

***Sheila da Silva Duque***

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

Prof.ª Dr.ª Cláudia Duarte da Cunha

Prof.ª Dr.ª Ana Luzia Lauria Filgueiras

Prof.ª Dr.ª Sandra de Souza Hacon

Prof. Dr. Josino Costa Moreira

Prof. Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas – Orientador principal

*Tese defendida e aprovada em 06 de março de 2012.*

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

# A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 06 de março de 2012.

_____

Sheila da Silva Duque

CG/Fa

Aos meus pais, que desde muito cedo me ensinaram o valor da educação e do trabalho e também a nunca desistir de lutar pelos meus sonhos.

**Agradecimentos**

Ao Prof. Paulo Rubens Guimarães Barrocas, por sua grande ajuda e incentivo, indispensáveis para o sucesso deste trabalho, pelas infinitas discussões que enriqueceram meu pensamento científico e principalmente por sua disposição de me orientar nesta tarefa desafiadora;

À Dra. Adriana Hamond Regua Mangia, pela cooperação, atenção, sugestões, observações e por ceder o local para a realização de grande parte desta pesquisa;

À Dra. Ana Luzia Lauria Filgueiras, pela amizade, incentivo, carinho e paciência em momentos importantes da minha vida;

Ao Dr. Ernesto Hofer, por sua sabedoria e compreensão, fundamentais nos períodos mais intranqüilos deste trabalho e na minha vida profissional;

À Dra. Maria Cristina Rodrigues Guilam, a coordenadora mais carinhosa, confiável e compreensiva que qualquer programa de pós-graduação poderia ter;

À amiga Ana Cláudia Santiago de Vasconcellos, sempre divertida, solidária, inteligente e muito eficiente na função de "compradora oficial" do projeto;

Aos biólogos Adriana de Lima Almeida Bezerra, Thiago Figueiredo e Raquel Costa de Luca Rebello, por todo apoio, empenho e dedicação profissional;

Aos amigos Wagner Esteves, Jacqueline Thomé, Graziele Mendes e Thaís Campos, pela convivência alegre e sincera disposição em ajudar no que fosse necessário;

À amiga e co-responsável pelo sucesso desta pesquisa, Anna De Falco, pela solidariedade, empenho e pela valiosa ajuda durante a análise dos resultados;

À equipe da Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS / FIOCRUZ: Aline Moreira, Renata Almeida e Vivian Areias, pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade e profissionalismo;

Aos pesquisadores-colaboradores do projeto, que coletaram as amostras de água em Rondônia (Dr. Wanderley Bastos, UNIR), Mato Grosso (Dr. Renato Farias, ICV) e Rio Grande do Sul (Dr. Felipe Niencheski, FURG) e as enviaram com tanto cuidado e eficiência ao nosso laboratório;

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto;

À ENSP / FIOCRUZ, pela oportunidade de participar do curso de doutorado e avançar na minha vida científica;

E finalmente, meu reconhecimento sincero a todos que de alguma maneira, direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”.

Winston Churchill

**Resumo**

Palavras-chave: mercúrio, bactéria, resistência, gene *merA*, biorremediação.

O mercúrio (Hg) é considerado um dos poluentes ambientais mais perigosos, devido a sua persistência no ambiente, eficiente transporte atmosférico e elevada toxicidade. A biogeoquímica do Hg em ambientes aquáticos é controlada principalmente por reações mediadas por bactérias. Dentre elas, a mais relevante do ponto de vista da redução do risco do Hg é a redução dos íons mercúricos à forma elementar, menos tóxica, devido à presença do gene *merA*, que codifica a enzima mercúrio-redutase. Neste estudo, 123 bactérias Gram-negativas resistentes ao Hg foram isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros (RJ, RO, MT e RS). Foram isoladas bactérias resistentes ao Hg em todos os pontos de coleta. A maioria dos isolados foi identificada como *E. cloacae*, *K. pneumoniae, Pantoea* sp., *E. coli* e *Serratia* sp., indicando contaminação fecal das áreas estudadas. Independente do histórico de contaminação mercurial local, a maioria das amostras apresentou Concentração Mínima Inibitória de Hg igual a 20 μM e foi resistente a pelo menos um dos antimicrobianos testados. O gene *merA* foi detectado em 91 % dos isolados, utilizando PCR. A caracterização do gene *merA* através de sequenciamento confirmou a especificidade dos produtos de amplificação que apresentaram grande similaridade entre si e uma alta divergência genética em relação às sequências identificadas em outros países. Isto sugere a ocorrência de eventos genéticos ao longo do tempo, que resultaram no polimorfismo genético observado no gene *merA*. A partir dos dados obtidos neste estudo, esperamos contribuir para o avanço do conhecimento sobre a resistência ao Hg, relacionada ao gene *merA* e suas possíveis aplicações para a biorremediação da poluição ambiental.

**Abstract**

Keywords: mercury, bacteria, resistance, *merA* gene, bioremediation.

Mercury (Hg) is considered one of the most dangerous environmental pollutants, due to its persistence, efficient atmospheric transport and high toxicity. The biogeochemistry of Hg in aquatic environments is controlled mainly by reactions mediated by bacteria. Among them, the most relevant for the reduction of Hg risk is the reduction of mercuric ions to elemetal form, less toxic, due to the presence of *merA* gene that codes the mercury reductase enzyme. In this study, 123 Gram-negative bacteria resistant to Hg were isolated from aquatic ecosystems in Brazil. Hg resistant bacteria were isolated in all sampling sites. The majority of isolated bacteria were identified as *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *Pantoea* sp., *E. coli* and *Serratia* sp., indicating fecal contamination of the studied areas. Regardless of past mercury contamination, most isolated bacteria showed $MIC_{Hg}$ equal to 20 μM and were resistant to at least one of the tested antimicrobials. The *merA* gene was detected in 91 % of the isolated bacteria, using PCR. The *merA* characterization based on gene sequencing, confirmed the specificity of the amplification products that showed high similarity among themselves and high genetic divergence from the other *merA* sequences, identified in other countries. This suggests the occurrence of genetic events during evolution of *merA* gene, resulting in the observed genetic polymorphism. We expect that the data obtained in this study will contribute for a better understanding of the Hg resistance mechanism related to the *merA* gene and its possible applications in the environmental pollution bioremediation.

**Lista de Abreviaturas**

**µm** = micrometro

**µL** = microlitro

**µg** = micrograma

**µM** = micromolar

**A** = adenina

***A. baumannii*** = *Acinetobacter baumannii*

**AMP** = Ampicilina

**ANVISA** = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC** = *American Type Culture Collection*

**BA** = Bahia

**BLAST** = *Basic Local Alignment Sequence Tool*

***B. cepacia*** = *Burkholderia cepacia*

**C** = Cloranfenicol

**C** = citosina

**°C** = grau Celsius

**CLSI** = *Clinical Laboratory and Standards Institute*

**cm** = centímetro

**$CMI_{Hg}$** = Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio

**CNPq** = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**$CO_2$** = dióxido de carbono

**ddATP** = dideoxiadenosina trifosfato

**ddTTP** = dideoxitimidina trifosfato

**ddCTP** = dideoxicitidina trifosfato

**ddGTP** = dideoxiguanosina trifosfato

**DNA** = ácido desoxirribonucléico

**dNTPs** = desoxirribonucleotídeos fosfatados

**DSSA** = Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental

***E. aerogenes*** = *Enterobacter aerogenes*

***E. asbu****riae* = *Enterobacter asburiae*

***E. cloacae*** = *Enterobacter cloacae*

***E. coli*** = *Escherichia coli*

**ENSP** = Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

**FIOCRUZ** = Fundação Oswaldo Cruz

**g** = grama

**G** = guanina

**g Hg/L** = grama de mercúrio por litro

***GenBank*** = banco de dados genéticos de acesso livre

**Gm** = Gentamicina

**$H_2S$** = sulfeto de hidrogênio

**Hg** = mercúrio

**$Hg^0$** = mercúrio elementar ou mercúrio metálico

**$Hg^+$** = íon mercuroso

**$Hg^{2+}$** = íon mercúrico

**Hg (II)** = somatório das espécies químicas inorgânicas do íon mercúrico

**$Hg^R$** = resistente ao mercúrio

**$Hg^S$** = sensível ao mercúrio

**K** = Canamicina

***K. cryocrescens*** = *Kluyvera cryocrescens*

***K. oxytoca*** = *Klebsiella oxytoca*

***K. pneumoniae*** = *Klebsiella pneumoniae*

**Kb** = quilobases

**L** = litro

***L. adecarboxylata*** = *Leclercia adecarboxylata*

***merA*** = gene que codifica a síntese da enzima MerA

**MerA** = enzima mercúrio-redutase

***merB*** = gene que codifica a síntese da enzima MerB

**MerB** = enzima organomercúrio-liase

***merC*** = gene que codifica a síntese da proteína MerC

***merD*** = gene que codifica a síntese da proteína MerD

**MerD** = proteína reguladora MerD

***merE*** = gene que codifica a síntese da proteína MerE

***merF*** = gene que codifica a síntese da proteína MerF

***merG*** = gene que codifica a síntese da proteína MerG

***merP*** = gene que codifica a síntese da proteína MerP

**MerP** = proteína transportadora MerP

***merR*** = gene que codifica a síntese da proteína MerR

**MerR** = proteína reguladora MerR

***merT*** = gene que codifica a síntese da proteína MerT

**MerT** = proteína transportadora MerT

**mL** = mililitro

**mm** = milímetro

**mM** = milimolar

**MR** = multi-resistência

**MT** = Mato Grosso

**NADPH** = Nicotinamida adenina dinucleotídeo

**NAL** = Ácido Nalidíxico

**NCCLS** = *National Committee for Clinical Laboratory Standards*

**ng** = nanograma

**NIH** = *National Institutes of Health*

***P. putida*** = *Pseudomonas putida*

**pb** = pares de bases

**pH** = potencial hidrogeniônico

**PCR** = Reação em Cadeia da Polimerase

**PM** = peso molecular

**pmol** = picomolar

**PVC** = policloreto de vinila

***R. ornithinolytica*** = *Raoultella ornithinolytica*

***R. terrigena*** = *Raoultella terrigena*

**RFLP** = análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA

**RNA** = ácido ribonucléico

**RNAm** = RNA mensageiro

**RJ** = Rio de Janeiro

**RO** = Rondônia

**RS** = Rio Grande do Sul

**S** = Estreptomicina

***S. maltophila*** = *Stenotrophomonas maltophila*

**SP** = São Paulo

***S. odorifera*** = *Serratia odorifera*

***S. paucimobilis*** = *Sphingomonas paucimobilis*

**SXT** = Sulfametoxazol-Trimetoprim

**T** = timina

**TBE** = tampão Tris-Borato-EDTA

**T-COFFEE** = *Tree-based Consistency Objective Function For alignment Evaluation*

**TE** = Tetraciclina

**Tn*21*** = família de transposons carreadores de genes de resistência a antimicrobianos e mercúrio

**Tn*501*** = transposon carreador de genes de resistência ao mercúrio

**TSA** = Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

**U** = unidade de concentração enzimática

**v/v** = proporção pela razão entre os volumes do solvente e do soluto ou de duas soluções

***V. metschnikovii*** = *Vibrio metschnikovii*

**Sumário**


1. Introdução 1
1.1. Mercúrio 1
1.1.1. Propriedades e Características Gerais 1
1.1.2. Utilização e Emissão para o Ambiente 2
1.1.3. Histórico de Contaminação 3
1.1.4. Toxicologia do Mercúrio 5
1.1.5. Ciclo Biogeoquímico 7
1.2. Bactérias 8
1.2.1. Conceitos Fundamentais 8
1.2.2. Enterobactérias 9
1.2.3. Bastonetes Gram-negativos Não-Fermentadores de Glicose 9
1.2.4. Aspectos Genéticos da Resistência Bacteriana 10
1.3. Resistência Bacteriana ao Mercúrio 11
1.3.1. Operon *mer* 12
1.3.2. Diversidade do Gene *merA* nas Bactérias 14
1.3.3. Associação entre Resistência Bacteriana ao Mercúrio e a Antimicrobianos 15
1.3.4. Estudos Realizados sobre a Resistência Bacteriana ao Mercúrio no Brasil e no Mundo 16
1.3.5. Aplicabilidade de Bactérias Resistentes ao Mercúrio para a Biorremediação da Contaminação Mercurial 17
1.4. Importância deste Estudo e Contribuições para a Saúde Pública 18
2. Objetivos 19
2.1. Objetivo Geral 19
2.2. Objetivos Específicos 19
3. Material e Métodos 20
3.1. Contextualização deste Projeto dentro da Linha de Pesquisa 20
3.2. Áreas de Estudo 20
3.3. Metodologia de Coleta de Água 23
3.4. Seleção e Isolamento de Bactérias Resistentes ao Mercúrio Inorgânico 24
3.5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio ($CMI_{Hg}$) 24
3.6. Identificação das Bactérias Resistentes ao Mercúrio 25

3.7. Preservação das Bactérias Resistentes ao Mercúrio 26
3.8. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) 26
3.9. Detecção do Gene *merA* no Genoma das Bactérias Resistentes ao Mercúrio Utilizando a Técnica de PCR 27
3.9.1. Extração do DNA Genômico Bacteriano 27
3.9.2. Metodologia para a Detecção do Gene *merA* 27
3.9.3. Parâmetros da PCR Utilizando a Enzima Taq DNA Polimerase Recombinante 28
3.9.4. Parâmetros da PCR Utilizando a Enzima Platinum® Taq DNA Polimerase 28
3.9.5. Eletroforese do DNA 28
3.10. Purificação e Quantificação do DNA 29
3.11. Sequenciamento do DNA 29
3.12. Interpretação dos Dados Gerados pelo Sequenciamento 30
4. Resultados e Discussão 31
4.1. Presença de Bactérias Gram-negativas Resistentes ao Mercúrio nos Sistemas Aquáticos 31
4.2. Nível de Resistência ao Mercúrio Inorgânico Apresentado pelas Bactérias 34
4.3. Características Bioquímicas das Bactérias Resistentes ao Mercúrio 35
4.4. Significado da Predominância do Isolamento de Enterobactérias Resistentes ao Mercúrio nos Sistemas Aquáticos 43
4.5. Variações do Metabolismo Bacteriano frente aos Substratos Bioquímicos 44
4.6. Relação entre os Níveis de Resistência ao Mercúrio Apresentados pelas Bactérias de acordo com as Regiões Geográficas de Origem 47
4.7. Associação entre as Resistências ao Mercúrio e a Antimicrobianos nas Bactérias 50
4.8. Presença do Gene *merA* nas Bactérias Resistentes ao Mercúrio 60
4.9. Análise Comparativa dos Resultados gerados pelas Enzimas Taq DNA Polimerase Recombinante e Platinum® 67
4.10. Presença do Gene *merA* em Bactérias Resistentes ao Mercúrio e a Antimicrobianos 74
4.11. Resultados do Sequenciamento dos Fragmentos do Gene *merA* Detectados nas Bactérias 74
4.12. Presença de Polimorfismo no Gene *merA* das Bactérias 78

4.13. Significado dos Achados deste Estudo no Contexto da Poluição Ambiental, da Biorremediação e da Saúde Pública 81
5. Conclusões 83
6. Recomendações 85
7. Referências Bibliográficas 86

**Lista de Tabelas**


Tabela 1 – Relação dos Pontos de Coleta Selecionados para a Pesquisa de Bactérias Resistentes ao Mercúrio 22

Tabela 2 – Número de Amostras de Água Coletadas e de Isolados Bacterianos de acordo com a Região Geográfica de Origem 32

Tabela 3 – Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio ($CMI_{Hg}$) Apresentada pelas Bactérias Isoladas 35

Tabela 4 – Espécies Bacterianas Isoladas nas Diferentes Regiões Geográficas Incluídas no Estudo 37

Tabela 5 – Relação de Espécies Bacterianas Identificadas de acordo com a Origem 41

Tabela 6 – Variações Metabólicas Apresentadas pelos Isolados de *E. cloacae* 45

Tabela 7 – Variações Metabólicas Apresentadas pelos Isolados de *K. pneumoniae* 46

Tabela 8 – Variações Metabólicas Apresentadas pelos Isolados de *Pantoea* sp. 47

Tabela 9 – Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio Apresentada pelas Bactérias Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos 49

Tabela 10 – Resistência a Antimicrobianos Apresentada pelas Bactérias Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos 51

Tabela 11 – Perfis de Resistência a Antimicrobianos Detectados nas Bactérias Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos 54

Tabela 12 – Perfis de Resistência a Antimicrobianos Detectados nas Espécies Bacterianas Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos 56

Tabela 13 – Relação entre o Número de Bactérias Resistentes ao Mercúrio e os Níveis de Amplificação Observados 66

Tabela 14 – Perfis de Amplificaçâo Gerados com Maior Frequência pelas Duas Metodologias de PCR 72

Tabela 15 – Similaridade Genética Apresentada pelos Fragmentos do Gene *merA* após o Sequenciamento 76

Tabela 16 – Similaridade Genética Apresentada após o Alinhamento dos Fragmentos do Gene *merA* Identificados neste Estudo e as Sequências do Gene Depositadas no *GenBank* 80

**Lista de Gráficos**

Gráfico 1 – Principais Gêneros e Espécies Bacterianos Identificados nos Ecossistemas Aquáticos 42
Gráfico 2 – Percentual de *E. cloacae* Multi-Resistentes a Antimicrobianos 57
Gráfico 3 – Percentual de *K. pneumoniae* Multi-Resistentes a Antimicrobianos 57
Gráfico 4 – Percentual de *Pantoea* sp. Multi-Resistentes a Antimicrobianos 58

**Lista de Figuras**

Figura 1 – Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio 8

Figura 2 – Representação Esquemática do Operon *mer* e sua Dinâmica de Regulação, Transporte e Redução de Íons de Mercúrio a sua Forma Elementar 13

Figura 3 – Locais Selecionados para a Coleta de Amostras de Água nos Estados do Rio de Janeiro, Rondônia, Mato Grosso e Rio Grande do Sul 23

Figura 4 – Representação Gráfica dos Perfis de Amplificação Observados nas Bactérias Isoladas a partir da Amplificação do Gene *merA* Utilizando as Enzimas Platinum® Taq DNA Polimerase e Taq DNA Polimerase Recombinante 64

Figura 5 – Visualização de Fragmentos de Tamanhos Variados a partir da Amplificação do Gene *merA* Utilizando a Enzima Platinum® Taq DNA Polimerase 64

Figura 6 – Visualização do Fragmento de 1234 pb a partir da Amplificação do Gene *merA* Utilizando a Enzima Taq DNA Polimerase Recombinante 65

**Lista de Quadros**

Quadro 1 – Perfis de Resistência a Antimicrobianos Observados nos Isolados Bacterianos Resistentes ao Mercúrio 52

Quadro 2 – Perfis de Amplificação Observados nas Bactérias Resistentes ao Mercúrio Submetidas aos Dois Protocolos de PCR 62

Quadro 3 – Substratos Enzimáticos e Bioquímicos Contidos no BBL™ Crystal™ Enteric / Nonfermenter ID Kit 106

Quadro 4 – Substratos Enzimáticos e Bioquímicos Contidos no API® 20E 108

**Lista de Anexos**


Anexo 1 – Meios de Cultura, Reagentes e Soluções 101

Anexo 2 – Técnica de Coloração de Gram 104

Anexo 3 – Procedimentos Realizados para a Identificação das Bactérias Gram-negativas Resistentes ao Mercúrio 105

Anexo 4 – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos 109

Anexo 5 – Purificação dos Produtos de PCR 110

Anexo 6 – Procedimentos Realizados para o Sequenciamento de DNA 111

Anexo 7 – Alinhamento Múltiplo Utilizando o Programa T-COFFEE para a Comparação das Sequências Genéticas Identificadas na Amostragem Bacteriana Estudada e o Fragmento do Gene *merA* descrito por Liebert *et al*. [56] 113

Anexo 8 – Alinhamento Múltiplo Utilizando o Programa T-COFFEE para a Comparação das Sequências Genéticas Identificadas na Amostragem Bacteriana Estudada 114

# 1. Introdução

No cenário da Saúde Ambiental, a prioridade dada aos estudos sobre poluentes químicos ambientais pode ser justificada pelo elevado número de substâncias químicas com potencial tóxico utilizadas nas diversas atividades econômicas e seu elevado potencial tóxico, contribuindo para o aumento da incidência de doenças, riscos para a saúde e óbitos. Em geral, existe mobilidade dos poluentes entre os diversos compartimentos ambientais e por este motivo o transporte dos poluentes é de particular interesse para avaliações de risco [1].

O estudo dos níveis de metais em matrizes ambientais vem sendo considerado prioritário nos programas de promoção da saúde em escala mundial, pois todas as formas de vida podem ser afetadas direta ou indiretamente pela presença de metais tóxicos, em detrimento da Saúde Pública. Muitos metais são essenciais para os organismos, porém, independente de apresentarem função biológica conhecida, todos os metais podem danificar os sistemas biológicos quando em altas concentrações [2].

A poluição por mercúrio apresenta-se como um problema em todo o mundo, devido a sua utilização doméstica, medicinal e industrial, apesar das recentes proposições de medidas por órgãos governamentais de vários países visando a redução do seu uso e sua emissão no ambiente. Atualmente, a presença de mercúrio tem sido detectada no solo e na biota aquática, tornando-se uma preocupação crescente devido à sua toxicidade, capacidade de acumulação em vários níveis da cadeia alimentar e sua embriotoxicidade, representando uma ameaça para a saúde humana e o ambiente [3,4].

## 1.1. Mercúrio

### 1.1.1. Propriedades e Características Gerais

O mercúrio (Hg) é um elemento químico de número atômico 80, massa atômica 200,5 e pontos de fusão igual a –38,87ºC e de ebulição 356,9ºC, portanto o Hg apresenta-se no estado líquido à temperatura ambiente (25ºC), sendo o único metal que possui esta característica. Quando a temperatura é aumentada, transforma-se em vapores tóxicos e corrosivos [5].

O mercúrio está presente naturalmente no ambiente, resultante de erupções vulcânicas e da sua mobilização na crosta terrestre. Não apresenta função biológica conhecida, pode ser altamente tóxico para os humanos dependendo de sua forma

química, possuindo três estados de oxidação: mercúrio elementar ($Hg^0$), íon mercuroso ($Hg^+$) e íon mercúrico ($Hg^{2+}$). O íon mercuroso é instável no ambiente e tende a se transformar nas duas outras formas. As formas iônicas podem combinar-se com outros elementos, como o enxofre, cloro e oxigênio, formando compostos de mercúrio inorgânicos, ou com o carbono, constituindo compostos de mercúrio orgânico [4].

Em sua forma elementar, o mercúrio pode ser inalado facilmente, devido a sua alta pressão de vapor, sendo absorvido nos pulmões, alcança a corrente sanguínea e pode atingir o cérebro. O mercúrio elementar pode ser transformado em formas tóxicas de mercúrio ($Hg^{2+}$ e metilmercúrio) nas hemácias, no fígado e no sistema nervoso central. Quando se apresenta como íon mercúrico, altamente reativo, o mercúrio é capaz de ligar-se aos grupamentos sulfidrila das enzimas e proteínas e interferir nas funções vitais celulares. Os compostos organomercuriais são lipossolúveis, sendo absorvidos facilmente pelo organismo humano e atravessando a barreira hemato-encefálica. A exposição prolongada ou repetida às formas mercuriais tóxicas resulta em tremores, distúrbios motores, alterações de comportamento e morte [4,5].

Além disso, o mercúrio pode associar-se a hidrocarbonetos gasosos e líquidos (petróleo, betumes), jazidas de carvão mineral e pode precipitar como sulfeto de mercúrio (cinábrio), quando há disponibilidade de enxofre nos depósitos vulcanogênicos. A jazida mais antiga de cinábrio é encontrada nas minas de Almadén, na Espanha [6].

### 1.1.2. Utilização e Emissão para o Ambiente

A utilização de mercúrio tem registro desde as eras mais remotas. Atualmente seu emprego é observado na odontologia e no garimpo de ouro, devido a sua propriedade de estabelecer liga metálica facilmente com o ouro e outros metais, produzindo amálgamas. Também é aplicado em alguns produtos de uso corrente, como instrumentos de medidas (termômetros e barômetros), corantes, lâmpadas fluorescentes, na indústria de explosivos e como catalisador em reações químicas [6].

As emissões mundiais de mercúrio na atmosfera têm sido estimadas em 8.000 toneladas por ano, sendo que mais da metade destas emissões são originadas de fontes naturais (erupções vulcânicas e presença em sedimentos) e o restante de fontes antropogênicas, como o processamento de minérios, fabricação de cloro / soda-cáustica, queima de combustíveis fósseis e incineração de resíduos médicos e biológicos [5,7].

A queima de combustíveis fósseis, como carvão, petróleo e gás, representa atualmente a mais importante fonte antropogênica de emissão de mercúrio na atmosfera, sendo estimada em aproximadamente 800 toneladas por ano [8].

O mercúrio é considerado um poluente global, pois em ambientes distantes das suas fontes de emissão, como na Antártica, Groenlândia e nos oceanos, podem ser encontradas concentrações de mercúrio acima dos níveis considerados naturais, o que comprova a importância dos processos de transporte atmosférico de larga escala do mercúrio na biosfera [7].

No Brasil, durante a década de 1980, as emissões de mercúrio para o solo, a água e a atmosfera consideradas mais expressivas foram, sem dúvida, originárias dos locais onde se praticava o garimpo de ouro. De acordo com dados fornecidos por órgãos governamentais, os estados brasileiros que apresentaram o maior consumo de mercúrio nas atividades de garimpo foram Rondônia, Mato Grosso e Pará [9].

Devido à toxicidade apresentada pelos compostos de mercúrio, sua utilização em formulações para a produção de cosméticos e antissépticos está sendo reduzida. Há registros da utilização de 24 toneladas de mercúrio pela indústria farmacêutica brasileira na década de 1980. A partir da década de 1990, a utilização caiu para 10 toneladas. Porém, o mercúrio continua sendo utilizado por odontologistas no preparo de amálgamas para restaurações dentárias [9,10].

Atualmente, a indústria de cloro-soda vem sendo apontada como uma das principais fontes de emissão do metal para o ambiente, mas a produção de lâmpadas, pilhas e baterias também contribuem significativamente para o aumento da poluição ambiental por mercúrio. Estes produtos apresentam os aterros sanitários como destinação final, assim como se acredita que a maior parte do mercúrio presente nos produtos médicos e farmacêuticos seja descartada nas redes de esgotos municipais [9,11,12].

### 1.1.3. Histórico de Contaminação

O mercúrio é considerado um dos poluentes ambientais mais perigosos, devido a sua elevada toxicidade, persistência no ambiente, eficiente transporte atmosférico e ampla distribuição geográfica.

O consumo desordenado deste metal e o descaso no seu manuseio e descarte resultaram em sérios desastres ao redor do mundo, que levaram um número significativo de pessoas à morte ou incapacitação.

Um importante episódio de envenenamento por mercúrio ocorreu no Japão, na década de 1950, na região de Minamata. A emissão de metilmercúrio pela fábrica Chisso Co., como resíduo da sua produção de PVC, atingiu um canal que conduzia à baía de Minamata, onde peixes e mariscos foram contaminados e consumidos pela população local. Com isso, foram causadas 121 intoxicações que resultaram em 46 casos fatais. Outros episódios de envenenamento ocorreram em Niigata, também no Japão, entre 1964 e 1965, na Suécia em 1960 e no Iraque, em 1956 e 1960 [9,13].

No Brasil, há registros de desastres ambientais envolvendo o lançamento de mercúrio em ecossistemas aquáticos na década de 1970. Na enseada dos Tainheiros / BA, a Companhia Química do Recôncavo liberou o metal como resíduo da fabricação de cloro-soda, envenenando peixes e crustáceos que foram consumidos pela população local. De maneira semelhante, o rio Pernambuco foi contaminado pela Companhia Igarassu, também produtora de cloro-soda e o rio Mogi-Guaçu / SP recebeu os efluentes contaminados por mercúrio da Indústria Champion de Papel e Celulose S.A. [9].

A partir da década de 1970, mas principalmente nos anos 80, foi iniciada uma intensa atividade de extração de ouro na região Amazônica. O mercúrio, devido a sua capacidade de formar amálgamas, tem sido utilizado para recuperar partículas de ouro de depósitos aluviais e, consequentemente, quantidades significativas de mercúrio elementar são liberadas no ambiente. O Brasil é o segundo maior produtor de ouro do mundo e estima-se que aproximadamente 2000 toneladas de mercúrio já foram lançadas no ambiente resultantes desta atividade [14,15].

Embora a atividade de mineração tenha diminuído nas últimas décadas, suas consequências para o ambiente e as populações locais continuam sendo observadas. Estudos desenvolvidos na região do rio Tapajós, o principal efluente do rio Amazonas, mostram que o mercúrio está presente em todos os compartimentos ambientais. Além disso, dados epidemiológicos e toxicológicos têm mostrado que as populações localizadas ao longo do rio Tapajós apresentam níveis de mercúrio acima do limite de tolerância determinado pela Organização Mundial de Saúde [14,16].

As indústrias de cloro e soda cáustica continuam sendo reconhecidas como importantes fontes de lançamento de mercúrio no ambiente aquático. Para diminuir o impacto do mercúrio na saúde e no meio ambiente, o Governo Federal criou a Lei 9.976/00 que proíbe a instalação de novas indústrias químicas para produção de cloro usando células de mercúrio. Entretanto, indústrias já instaladas têm um histórico de

lançamento de grandes quantidades de resíduos e, muitas vezes, funcionam sem a devida fiscalização dos órgãos ambientais [17,18].

### 1.1.4. Toxicologia do Mercúrio

Os metais apresentam uma distribuição ubíqua na natureza e estar exposto a eles é inevitável. A exposição a contaminantes presentes no ambiente pode acontecer através de fontes naturais, processos industriais, produtos comerciais e alimentos. O risco de toxicidade crônica depende da frequência, intensidade e duração do contato com o contaminante [19].

Os compostos mercuriais, diferente dos poluentes orgânicos, não podem ser decompostos ou degradados, podendo apenas ter sua forma química alterada para espécies menos tóxicas ou ser imobilizado no meio. Além disso, podem persistir indefinidamente no ambiente e tendem a se acumular através da cadeia alimentar dos ecossistemas [13]. Por isso, sua detecção e remoção são essenciais para evitar os casos de envenenamento por mercúrio.

No corpo humano, o acúmulo do mercúrio resultante da exposição ocupacional ou ambiental, do consumo de alimentos contaminados e da utilização de amálgamas dentários, possui um importante significado na Saúde Pública. A exposição pode ocorrer através do contato com suas três formas: vapor de mercúrio (mercúrio elementar), mercúrio inorgânico e compostos organomercuriais. Estas formas são interconversíveis e todas podem produzir toxicidade sistêmica [19,20].

Aspectos importantes a serem considerados quanto à toxicidade do mercúrio em sistemas vivos são sua alta afinidade de ligação a proteínas e a capacidade apresentada pelos organomercuriais e pelo mercúrio elementar, de atravessar as membranas biológicas devido a sua lipossolubilidade. Como consequência dessas propriedades, inativam as enzimas e danificam as membranas biológicas [19,21].

A principal via de absorção do mercúrio elementar é através da inalação do vapor de mercúrio, que atravessa rapidamente a membrana dos alvéolos pulmonares, atinge a circulação e se distribui pela maioria dos tecidos, incluindo as hemácias, fígado e cérebro. Nas hemácias, a catalase intracelular oxida o $Hg^0$ para a forma divalente que se complexa à hemoglobina através da reação com grupos sulfidrila e atravessa a barreira hemato-encefálica, atingindo o sistema nervoso central. Esta espécie de mercúrio pode permanecer retida no tecido cerebral durante muitos anos, afetando

vários processos intracelulares, como a síntese de DNA, RNA e proteínas, a polimerização microtubular, a divisão e a migração celular [22].

Cerca de 80 % do vapor de mercúrio inalado é absorvido e pode atravessar a barreira placentária, se depositar nos rins ou atingir o trato gastrintestinal, de onde é excretado através das fezes. O vapor de mercúrio e seus metabólitos têm o efeito tóxico de desnaturar proteínas, inibir enzimas, interromper o transporte celular e a captação e liberação de neurotransmissores. A exposição crônica se manifesta através de excitabilidade aumentada, irritabilidade, tremores e gengivite [20,21].

No passado, o mercúrio inorgânico frequentemente estava presente em formulações de cosméticos e antissépticos. Este pode ser formado a partir do vapor de mercúrio ou metilmercúrio, não apresenta a capacidade de atravessar as barreiras hemato-encefálica e placentária e a exposição crônica pode se manifestar através de falência renal ou problemas gastrintestinais [20,21].

Considerada a forma mais tóxica de mercúrio, os compostos organomercuriais são encontrados na biota aquática, pesticidas, fungicidas, inseticidas e como conservante em vacinas. O metilmercúrio atravessa as barreiras hemato-encefálica e placentária, sendo absorvido pelo trato gastrintestinal e eliminado através das fezes e da urina. Os principais efeitos tóxicos são observados no sistema nervoso central, podendo causar parestesia, neuropatia periférica, perda de memória, distúrbios visuais, demência, tremores e depressão [20,21].

Além dos efeitos tóxicos do metilmercúrio sobre o desenvolvimento psico-motor, alguns estudos [23,24,25,26,27] consideram biologicamente plausível a hipótese que relaciona a ocorrência de autismo em crianças à presença do Timerosal em vacinas. O Timerosal é um sal composto por mercúrio (49,6 %) utilizado como conservante de produtos farmacêuticos e vacinas desde a década de 1930. Atualmente, vários países europeus e os EUA estão mobilizados para eliminar gradualmente o uso do timerosal em vacinas, evitando preparações de vacinas multidose, que continuam sendo adotadas em países em desenvolvimento. Porém, as informações obtidas até o momento são insuficientes para comprovar a hipótese da relação entre a exposição ao Timerosal e perturbações neurológicas infantis como o autismo, déficit de atenção, hiperatividade e deficiências da fala [22,28].

### 1.1.5. Ciclo Biogeoquímico

O ciclo ambiental do mercúrio (Figura 1) é mediado por processos geológicos, físico-químicos e biológicos, envolvendo suas três formas presentes no ambiente ($Hg^0$, $Hg^{2+}$ e suas formas orgânicas).

A principal forma de mercúrio na atmosfera é o vapor de mercúrio ($Hg^0$), emitido por fontes naturais e antropogênicas e distribuído globalmente na atmosfera. O vapor de mercúrio é volátil e oxidado a íon mercúrico ($Hg^{2+}$) como resultado de sua interação com o ozônio na presença de água. O mercúrio oxidado ($Hg^{2+}$) pode associar-se a outros íons formando compostos que se depositam na água e no solo, o que pode resultar na produção de metilmercúrio ou na sua volatilização, retornando para a atmosfera [29].

O mercúrio inorgânico presente na água e sedimentos pode ser submetido à conversão bacteriana em metilmercúrio, que é bioacumulado e biomagnificado na cadeia alimentar aquática, de modo que os predadores, localizados no topo da cadeia trófica, geralmente apresentam as maiores concentrações de mercúrio orgânico [30].

Considerando que a principal via de exposição humana não ocupacional ao mercúrio é através do consumo de peixes, moluscos e crustáceos contaminados com metilmercúrio, o risco de contaminação mercurial na população depende da concentração de mercúrio biodisponível nos níveis tróficos mais elevados do ecossistema [31].

A transformação de espécies inorgânicas do mercúrio em metilmercúrio ocorre, principalmente, através de uma reação mediada por bactérias. Por outro lado, existem outros grupos de bactérias capazes de demetilar o mercúrio ou mesmo detoxificá-lo através da redução do mercúrio inorgânico ao estado elementar. O mercúrio elementar possui baixa solubilidade em água e pouca reatividade, sendo praticamente inerte no ambiente aquático [29,32].

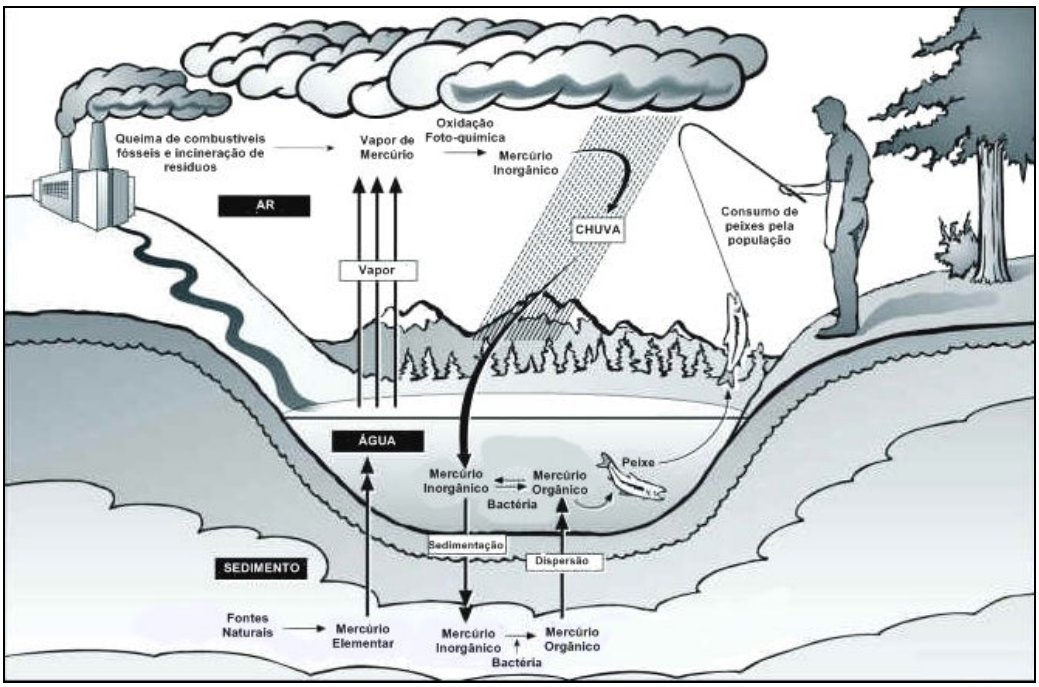



**Figura 1** – Ciclo Biogeoquímico do Mercúrio.
(Disponível em: http://www.mercury.utah.gov/atmospheric_transp.htm)

## 1.2. Bactérias

### 1.2.1. Conceitos Fundamentais

As comunidades bacterianas têm sido cada vez mais associadas à qualidade ambiental, tanto por seu papel fundamental para o funcionamento e a estabilidade dos ecossistemas através da reciclagem de nutrientes, decomposição de materiais tóxicos e manutenção das condições físico-químicas do meio, como por sua sensibilidade a variações ambientais causadas por processos naturais ou antropogênicos adversos.

Em geral, as bactérias apresentam características que motivam sua utilização em estudos *in vitro* como indicadores para a detecção de alterações no ambiente que possam interferir na saúde humana. Estes microrganismos requerem pouco espaço para o seu cultivo, por serem microscópicos, e apresentam uma estrutura celular e molecular menos complexa que os organismos superiores. Também são capazes de se adaptar a condições ambientais desfavoráveis e permitem o estudo da transmissão e modificação do material genético, além da regulação dos genes nas células em curto período de tempo, devido ao seu ciclo de vida rápido [33].

As bactérias são organismos unicelulares e procariontes, que podem apresentar a forma de bacilos, cocos ou espirilos e dispor-se em pares, cadeias ou grupos. Sua reprodução ocorre através de fissão binária, gerando duas células-filhas idênticas à célula-mãe. Para sua nutrição, podem utilizar compostos orgânicos, sintetizar seu

próprio alimento por fotossíntese ou utilizar substâncias inorgânicas para obtenção de energia. Atualmente, podem ser caracterizadas taxonomicamente tanto por testes convencionais que identificam propriedades metabólicas, quanto por técnicas de biologia molecular que detectam alvos genéticos específicos [33,34].

As bactérias podem ser classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas, de acordo com sua resposta à coloração de Gram, que se baseia na diferença estrutural apresentada pela parede celular dos dois tipos bacterianos. As bactérias Gram-positivas possuem uma quantidade maior de peptideoglicano em sua parede celular, o que torna a parede dessas bactérias mais espessa e rígida do que a das bactérias Gram-negativas. Por outro lado, as bactérias Gram-negativas possuem estrutura mais complexa, apresentando uma membrana externam composta por fosfolipídios, lipoproteínas e lipopolissacarídeos [34].

O metabolismo e o genoma bacteriano são estudados há muito tempo, por isso marcadores como os que conferem resistência a antimicrobianos e a íons inorgânicos, como o mercúrio, são bastante conhecidos. Dentre estes grupos bacterianos, membros da família Enterobacteriaceae e os bastonetes Gram-negativos não-fermentadores de glicose, grupo bacteriano que inclui *Pseudomonas* spp., destacam-se por incluírem espécies de importância clínica e ambiental [15,35,36,37,38].

### 1.2.2. Enterobactérias

As bactérias que integram a família Enterobacteriaceae são anaeróbias facultativas, catalase-positivas, oxidase-negativas, fermentam a glicose com ou sem produção de gás e reduzem nitrato a nitrito. A maioria apresenta motilidade devido à atividade de flagelos peritríqueos, mas também podem ser imóveis [34].

Habitam comumente o trato intestinal humano e de animais, tanto como residentes permanentes como agentes infecciosos. Entre as síndromes infecciosas causadas pelas Enterobactérias estão os abscessos, pneumonias, meningites, septicemias e infecções de feridas, do trato urinário e do trato gastrointestinal, relacionadas frequentemente a amostras patogênicas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. [34].

### 1.2.3. Bastonetes Gram-negativos Não-Fermentadores de Glicose

Este grupo de bactérias utiliza carboidratos como fonte de energia, degradando-os pela via oxidativa e não através da fermentação. A maioria destas bactérias apresenta

motilidade, são oxidase-positivas e estão presentes na água e no solo. As amostras mais frequentes no ambiente hospitalar, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., causam infecções em seres humanos e são frequentemente isoladas de respiradores, cateteres e sondas urinárias. Entre as principais síndromes infecciosas causadas por estas bactérias estão as pneumonias, meningites, septicemias, infecções de feridas e do trato urinário [34].

### 1.2.4. Aspectos Genéticos da Resistência Bacteriana

Atualmente, as infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos e metais tóxicos vêm se tornando mais frequentes na população, principalmente devido a sua circulação no ambiente hospitalar [39,40]. Deste modo, é de fundamental importância compreender os mecanismos de resistência bacteriana, para que seja possível adotar medidas de controle e prevenção.

A importância do ambiente não-clínico para o agravamento do problema da resistência bacteriana aos antibióticos ainda não foi esclarecida, devido à escassez de dados de monitoramento, porém deve ser examinada com atenção. O contato entre bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos e microrganismos ambientais nos ecossistemas poluídos pode resultar em aumento da resistência à maioria dos antimicrobianos clinicamente significativos nessas populações bacterianas [41].

Além do cromossomo bacteriano, existem estruturas genéticas como os elementos móveis que podem integrar o genoma bacteriano, oferecendo vantagens adaptativas e contribuindo para sua evolução. A existência destes elementos pode explicar os casos de alta instabilidade genômica observados em alguns microrganismos. Dentre os elementos facultativos, os plasmídios, constituídos por DNA circular e superespiralizado, apresentam a capacidade reversível de existirem integrados ao cromossomo ou em estado autônomo. Quando autônomos, podem duplicar-se independentemente da divisão do cromossomo, originando várias cópias. Outros elementos incluem sequências de DNA transponíveis para o genoma como as denominadas sequências de inserção (IS), pequenos elementos genéticos móveis que apresentam grande diversidade e são formados por nucleotídeos que codificam proteínas específicas. Entre os elementos transponíveis, estão os transposons, que apresentam sequências nucleotídicas maiores e conferem resistência às bactérias [33,42].

Alguns grupos bacterianos apresentam como característica natural a resistência intrínseca, mas em sua maioria os microrganismos apresentam uma resistência adquirida à atividade dos antimicrobianos. A aquisição da resistência pode ocorrer

através de mutações e transferência de genes por conjugação, transdução, transformação e transposição [41].

As mutações cromossômicas são consideradas a forma menos frequente de aquisição da resistência e ocorrem durante o processo de replicação das bactérias, como resultado de alterações aleatórias na sequência do DNA, que são naturalmente transferidas a futuras gerações. Com maior frequência, são observadas as transferências de genes de resistência seja por conjugação (plasmídios contendo genes de resistência são transferidos entre duas células bacterianas em contato direto), transdução (os genes são transferidos por intermédio de um bacteriófago), transformação (a transferência dos genes ocorre da célula doadora para a receptora sem que exista contato entre elas) ou transposição (os genes se transferem entre plasmídios, para o cromossomo ou para um bacteriófago, carreados por um transposon) [33,41,43].

Estudos de transferência horizontal de genes em bactérias ambientais são importantes para a compreensão dos mecanismos que levam à adaptação bacteriana a determinadas condições. Também permitem avaliar os riscos associados à propagação de genes de resistência entre as bactérias, que podem infectar humanos e animais, e identificar populações bacterianas que funcionem como reservatórios de genes de resistência no ambiente [43,44].

### 1.3. Resistência Bacteriana ao Mercúrio

Os ecossistemas são afetados pela poluição ambiental em vários níveis, desde o desequilíbrio do sistema até o desenvolvimento de resistência pela comunidade microbiana exposta ao estresse ambiental. Os metais tóxicos, por sua vez, são reconhecidos como poluentes tóxicos para a biota dos ecossistemas, influenciando a distribuição e a diversidade das comunidades microbianas devido a sua biodisponibilidade e toxicidade [45,46,47].

O mercúrio é liberado para o ambiente em formas biologicamente disponíveis através de vários processos geoquímicos e atividades antropogênicas. Devido à persistência do mercúrio em ambientes naturais, os microrganismos, principalmente as bactérias, têm desenvolvido resistência ao metal e sua utilização em biorreatores vêm sendo considerada promissora para a descontaminação ambiental do mercúrio [4,48,49].

Atualmente são conhecidos cinco mecanismos de resistência ao mercúrio desenvolvidos pelas bactérias: 1) Captação reduzida de íons mercúricos devido à redução na permeabilidade celular; 2) Demetilação de metilmercúrio através da

decomposição e complexação do mercúrio inorgânico pelo $H_2S$; 3) Sequestro de metilmercúrio; 4) Metilação do mercúrio por bactérias que utilizam este processo como um mecanismo de resistência; e 5) Redução enzimática de $Hg^{2+}$ a $Hg^0$ [29,50,51,52].

Para sobreviver aos efeitos tóxicos causados pelos compostos de mercúrio iônicos ou orgânicos, as bactérias desenvolveram um engenhoso mecanismo de resistência que consiste na conversão de compostos mercuriais tóxicos à sua forma menos tóxica e volátil, $Hg^0$ [53].

Este mecanismo é codificado por um agrupamento de genes em um único operon, denominado operon *mer*, ligado frequentemente a genes que codificam resistência a antibióticos. Este operon codifica enzimas que transformam o mercúrio inorgânico e os compostos organomercuriais em $Hg^0$, além de um sistema de transporte e funções necessárias para a regulação da expressão dos genes *mer* [53,54].

Na maioria dos casos, os genes que codificam a resistência bacteriana ao mercúrio estão presentes em transposons [55,56] e plasmídios conjugativos [29,57,58], o que facilita sua transferência horizontal e disseminação na população bacteriana [59], mas também podem estar localizados no cromossomo bacteriano [60,61].

A presença deste operon em bactérias resistentes ao mercúrio já foi observada em uma ampla variedade de amostras Gram-positivas e Gram-negativas, de origens humana, animal, clínica e ambiental, isoladas de várias localizações geográficas e representantes de diferentes espécies bacterianas [62].

### 1.3.1. Operon *mer*

Operons são conjuntos de genes localizados em posições próximas que codificam produtos com funções relacionadas e são transcritos contiguamente. Além disso, são controlados pelas mesmas sequências regulatórias e transcritos em um único RNA mensageiro [42].

Os operons *mer* variam quanto à estrutura e são constituídos por genes que codificam as proteínas funcionais para a regulação (*merR e merD*), transporte (*merT*, *merP*, *merC* e *merF*) e redução (*merA e merB*) [29,63].

O gene regulador *merR* é transcrito de maneira divergente dos outros genes *mer* e codifica uma proteína metalo-reguladora, MerR, que se liga ao operador-promotor regulando a expressão gênica através da repressão da transcrição dos demais genes estruturais do operon *mer* (*merTPCFAD*) na ausência de $Hg^{2+}$ e da ativação da transcrição na presença de $Hg^{2+}$, como pode ser observado na Figura 2. O gene *merD*

codifica uma segunda proteína reguladora, MerD, a qual se liga à mesma região operadora-promotora que MerR, embora com menor intensidade [30,59].

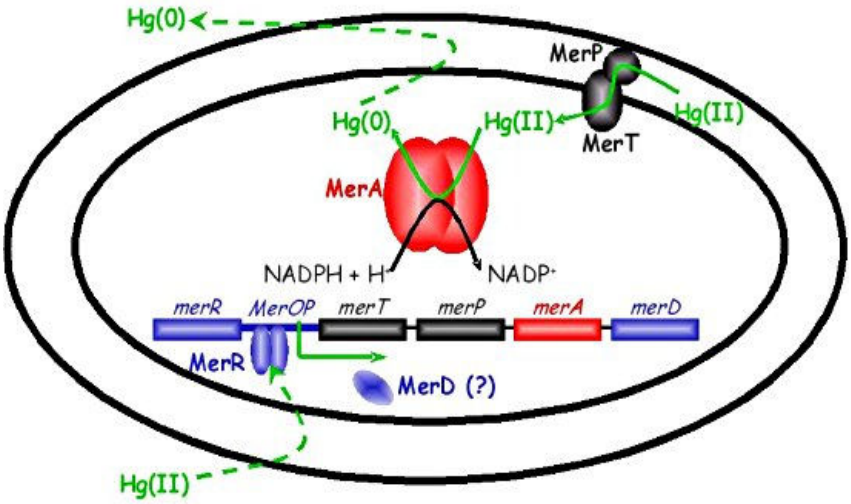



**Figura 2** – Representação Esquemática do Operon *mer* e sua Dinâmica de Regulação, Transporte e Redução de Íons de Mercúrio a sua Forma Elementar.
(Disponível em http://lchampier.free.fr/espacepro.php?activite=DEA)

Outros genes relacionados à resistência organomercurial têm sido identificados, como *merG* e *merE.* Todos os operons *mer* possuem os genes *merT* e *merP*, entretanto, alguns operons possuem adicionalmente *merC*, que parece não ser essencial para a resistência a $Hg^{2+}$. Outro gene *mer* foi associado ao transporte de mercúrio, *merF*, observado no plasmídeo de uma amostra de *Pseudomonas fluorescens*. Os genes *merA* e *merB* são imediatamente subsequentes no operon aos genes relacionados à função de transporte [64,65,66,67].

A resistência bacteriana ao mercúrio pode ser classificada em resistência de espectro limitado e resistência de amplo espectro. As bactérias que apresentam um espectro amplo de resistência possuem os genes *merA* e *merB*, de modo que o composto organomercurial é inicialmente decomposto pela enzima organomercúrio-liase (MerB), a partir da clivagem da ligação entre os átomos de carbono e mercúrio, o Hg (II) formado é então reduzido a $Hg^0$ pela ação da enzima mercúrio-redutase (MerA). Por outro lado, as bactérias que não possuem o gene *merB* apresentam um espectro limitado de resistência, pois são resistentes somente a compostos mercuriais inorgânicos [5,53].

A base bioquímica da resistência bacteriana aos compostos inorgânicos de mercúrio envolve a redução do $Hg^{2+}$ a $Hg^0$ através da enzima MerA. Esta redutase é uma flavoproteína que catalisa a redução de $Hg^{2+}$ a $Hg^0$, o que permite a difusão do

mercúrio metálico para o exterior da célula devido à alta pressão de vapor e lipossolubilidade. A MerA está presente no interior da célula bacteriana e é induzida por concentrações sub-inibitórias de íons mercúricos e várias substâncias organomercuriais. Os íons mercúricos são transportados para o interior da célula por proteínas de transporte. Esse mecanismo envolve a ligação do $Hg^{2+}$ a um par de resíduos de cisteína presente na proteína MerP, localizada no periplasma. Então, o $Hg^{2+}$ é transferido para o par de resíduos de cisteína presente na proteína MerT, na membrana citoplasmática, e finalmente para o par de cisteínas no sítio ativo da enzima MerA, presente no citoplasma. A partir daí, o $Hg^{2+}$ é reduzido a $Hg^{0}$ numa reação NADPH-dependente, o $Hg^{0}$ é liberado no citoplasma bacteriano e se difunde para o meio externo. Quando a enzima MerB, está presente, cliva as ligações organometálicas e torna o Hg (II) disponível para a ação da enzima MerA [30,59].

Como a resistência ao mercúrio está associada, na maioria dos casos, a transposons e plasmídios conjugativos, a transferência horizontal e a disseminação dos genes de resistência ao mercúrio na população bacteriana são facilitados. Naturalmente, bactérias resistentes ao mercúrio devido à presença do gene *merA*, que recebem o gene *merB* a partir do mecanismo de conjugação, passam a apresentar uma resistência de amplo espectro, o que aponta a transferência horizontal de genes como o principal mecanismo de promoção da diversidade metabólica em comunidades microbianas adaptadas ao ambiente [53,68].

### 1.3.2. Diversidade do Gene *merA* nas Bactérias

Os marcadores associados à resistência bacteriana ao mercúrio têm apresentado diversidade genética tanto em amostras Gram-negativas quanto em Gram-positivas, sejam de origem ambiental ou clínica, isoladas de várias partes do mundo [62,69].

A partir dos resultados dos primeiros estudos [70,71,72,73], utilizando como modelos os transposons Tn*21* e Tn*501*, parecia que a organização do operon *mer* nas bactérias Gram-negativas era conservada. Entretanto, observando as mais de 20 sequências deste operon descritas até o momento, não há dúvidas quanto ao seu polimorfismo em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas [54,62,69,74,75,76].

A diversidade e a abundância do operon *mer* na natureza podem refletir a pressão seletiva exercida pela presença do mercúrio no ambiente [75]. A importância da transferência gênica na ecologia das comunidades microbianas permanece indeterminada e sua investigação depende do desenvolvimento de metodologias para

monitorar o fluxo gênico nas amostras ambientais, o que pode ser alcançado com a utilização de ferramentas de biologia molecular e bioinformática.

### 1.3.3. Associação entre Resistência Bacteriana ao Mercúrio e a Antimicrobianos

A presença de poluentes orgânicos e inorgânicos, incluindo resíduos de antibióticos, tem sido detectada em níveis significativos e crescentes no ambiente, decorrente da sua utilização clínica, industrial e agrícola intensiva [77].

As bactérias apresentam características como a capacidade de transferir material genético entre amostras da mesma espécie ou de espécies diferentes, e se adaptar rapidamente a fatores adversos, como a exposição a agentes químicos potentes. Por isso, a resistência bacteriana a antimicrobianos pode ser considerada uma resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no ambiente [78,79].

Os antimicrobianos são substâncias químicas produzidas por microrganismos ou por via sintética. Apresentam a capacidade de matar (bactericidas) ou inibir o crescimento (bacteriostáticos) das bactérias e são agrupados em classes, de acordo com sua estrutura química e mecanismo de ação [78,79].

Vários estudos [35,80,81,82] sugerem a existência de uma associação frequente entre a resistência bacteriana ao mercúrio e aos antimicrobianos Ampicilina, Tetraciclina, Canamicina, Gentamicina, Estreptomicina, Ácido Nalidíxico, Cloranfenicol e Sulfametoxazol-Trimetoprim.

Estes antimicrobianos atuam no metabolismo bacteriano de diferentes formas. As penicilinas, grupo que inclui a Ampicilina, atuam impedindo a formação da parede celular durante o estágio de replicação bacteriana. Alguns antimicrobianos, como a Tetraciclina, a Canamicina, a Gentamicina, a Estreptomicina e o Cloranfenicol, impedem a síntese de proteínas bacterianas. Outros antibióticos, como o Ácido Nalidíxico e o Sulfametoxazol-Trimetoprim, interferem na síntese de ácidos nucléicos pela célula bacteriana [78,79,83].

O uso indiscriminado, errôneo ou desnecessário de antimicrobianos ao longo dos anos é apontado como um dos maiores agentes potenciais do surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos mais comumente usados, devido à pressão seletiva que a presença deles exerce. As bactérias se adaptam, como resultado de mutações genéticas ou transferência horizontal de genes de resistência, e sobrevivem a mudanças das condições ambientais gerando descendentes mais resistentes aos antimicrobianos [44,78,84].

A importância da transferência gênica na ecologia das comunidades microbianas é muito relevante, pois possibilita que as funções metabólicas dos microrganismos sejam alteradas. Os genes relacionados à sobrevivência e multiplicação microbiana nesses ambientes, frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, codificam a resistência a antibióticos e metais tóxicos simultaneamente [39,40,53,85].

### 1.3.4. Estudos Realizados sobre a Resistência Bacteriana ao Mercúrio no Brasil e no Mundo

Desde o final da década de 1960, vêm sendo realizados estudos sobre a resistência bacteriana ao mercúrio. Os primeiros estudos [86,87] restringiam-se ao isolamento de bactérias de importância clínica resistentes ao mercúrio e à determinação da concentração mínima inibitória deste metal sobre elas.

Em pouco tempo, começaram a ser publicados os primeiros resultados relacionados à pesquisa de plasmídios bacterianos carreadores dos genes determinantes da resistência ao mercúrio entre as bactérias patogências mais comuns, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* [88,89,90,91].

Com os estudos de Fox e Walsh [92] e Misra *et al*. [93] foram iniciadas as pesquisas associando a resistência bacteriana ao mercúrio à existência do operon *mer*, à atividade dos transposons e à síntese da enzima MerA. Nos anos seguintes, além de descrever a estrutura e a função do operon *mer*, começaram a ser estudadas sua ecologia, distribuição e evolução, visando compreender a distribuição dos genes de resistência ao mercúrio nas bactérias e seus efeitos na saúde ambiental [53].

Atualmente, muitos estudos descrevem a existência de uma grande divergência entre os genes que compõem o operon *mer*, identificados em amostras bacterianas resistentes ao mercúrio isoladas de água e solos contaminados, assim como em bactérias causadoras de infecção em humanos e animais [13,56,63,94,95,96].

Ao contrário dos outros países, onde se observa um número elevado e crescente de estudos sobre o mecanismo bacteriano de redução do mercúrio, seus determinantes genéticos de resistência e sua diversidade molecular, a maioria das pesquisas sobre mercúrio realizadas no Brasil continua sendo direcionada à determinação da presença e quantificação deste metal em ambientes contaminados [97,98,99,100,101,102]. Nestes estudos, os autores buscaram esclarecer os efeitos químicos e ecotoxicológicos dos compostos mercuriais sobre a saúde humana e dos ecossistemas.

Dentre os trabalhos publicados sobre a resistência bacteriana ao mercúrio no Brasil, a maioria teve como objetivo o isolamento de bactérias resistentes ao mercúrio e a antimicrobianos em amostras de origem alimentar [103], clínica [36] e ambiental [104,105,106,107,108]. As outras investigações abordaram a transferência dos genes de resistência ao mercúrio através de plasmídios bacterianos [109], o isolamento de bactérias capazes de volatilizar o mercúrio [38] e o potencial de um marcador molecular para a identificação do gene *merA* [110].

### 1.3.5. Aplicabilidade de Bactérias Resistentes ao Mercúrio para a Biorremediação da Contaminação Mercurial

Para ser considerado eficiente, um processo biotecnológico deve ser econômico e apresentar rendimento máximo em tempo mínimo. Por isso, a Biotecnologia está baseada principalmente no emprego de células microbianas para desenvolver produtos ou processos de interesse científico, econômico e social [33].

A Biotecnologia apresenta-se como uma ferramenta essencial para a Biorremediação, contribuindo para a compreensão, preservação e restauração do ambiente. A utilização de processos de Biorremediação permite a transformação de poluentes em substâncias menos tóxicas a partir da atividade enzimática bacteriana, capaz de metabolizar diversos resíduos [111]. Devido ao seu custo e impacto ambiental serem relativamente baixos, a Biorremediação parece ser uma boa alternativa e tem sido empregada em todo o mundo apresentando resultados satisfatórios [37].

Entretanto, uma limitação importante refere-se à natureza dos microrganismos, que realizam suas atividades metabólicas sob condições ambientais que atendam às suas necessidades e às vezes necessitam de incentivos nutricionais para degradar o poluente a uma taxa aceitável, o que dificulta a execução do processo *in situ*. Assim como, em muitos casos, o microrganismo deve ser apresentado inicialmente a baixos níveis do poluente durante um período de tempo para que seja induzido a ativar as vias metabólicas necessárias para degradar o poluente [111].

Os crescimentos da população e das atividades industriais contribuíram para que a poluição ambiental atingisse altos níveis. Estudos recentes [12,37,49,112,113] têm apontado o mecanismo de resistência bacteriano determinado pelo gene *merA* como o mais eficaz nos processos de biorremediação do mercúrio, fazendo com que o uso de bactérias capazes de detoxificar este metal seja considerado a alternativa mais promissora para a descontaminação de ambientes poluídos [4,48].

## 1.4. Importância deste Estudo e Contribuições para a Saúde Pública

A elevada toxicidade do mercúrio, sua facilidade de dispersão no ambiente, seu potencial de contaminação da cadeia alimentar aquática - o que aumenta a exposição da população ao metilmercúrio através da dieta - e seus níveis crescentes devido à contribuição antropogênica, representam uma importante questão de Saúde Pública. Por isso, a partir dos dados obtidos neste estudo, esperamos contribuir para a mitigação dos efeitos da poluição por mercúrio, reduzindo a exposição humana ao mercúrio e seus consequentes efeitos danosos à saúde.

O número limitado de pesquisas em nosso país que contribuam para o avanço do conhecimento sobre o mecanismo de resistência ao mercúrio relacionado ao gene *merA* e suas possíveis aplicações para a biorremediação da poluição ambiental, assim como, que forneçam dados sobre a sua diversidade genética em bactérias isoladas de diferentes ecossistemas aquáticos brasileiros, justifica a relevância e a originalidade do presente estudo.

# 2. Objetivos

## 2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o gene *merA* de bactérias Gram-negativas, isoladas de ecossistemas aquáticos brasileiros, a fim de conhecer a sua diversidade e avaliar a sua aplicabilidade para a biorremediação da poluição pelo mercúrio.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e identificar bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio inorgânico de ecossistemas aquáticos brasileiros;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória de mercúrio inorgânico nas bactérias Gram-negativas isoladas;
- Avaliar a resistência a antimicrobianos nas bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio isoladas;
- Identificar a presença do gene *merA* nas bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio através da técnica de PCR;
- Analisar comparativamente sequências do gene *merA* através do sequenciamento de DNA.

## 3. Material e Métodos

### 3.1. Contextualização deste Projeto dentro da Linha de Pesquisa

Este estudo está inserido na linha de pesquisa: "Estudo dos Ciclos Biogeoquímicos de Poluentes e seus Efeitos na Saúde Humana e dos Ecossistemas", desenvolvida pelo Dr. Paulo Rubens Guimarães Barrocas, pesquisador do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental (DSSA) / Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP) / Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). O projeto "Identificação e Caracterização de Bactérias Resistentes ao Mercúrio de Sistemas Aquáticos Brasileiros para uso em Biorremediação", desenvolvido no período de 2008 a 2010 e financiado pelo Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde V / FIOCRUZ / CNPq (processo nº 403617 / 2008-1) deu origem à proposta desta tese. Entretanto, o primeiro projeto desenvolvido sobre o tema ("Estudo da Biodisponibilidade e da Resistência Bacteriana ao Mercúrio") nesta linha de pesquisa, iniciou-se em 2005, quando foram coletadas amostras de água em várias regiões do país.

O objetivo das coletas consistia em isolar bactérias resistentes ao mercúrio de ecossistemas aquáticos brasileiros e mantê-las em estoque para estudos bacteriológicos, genéticos e químicos, que possibilitem a futura utilização destas bactérias em biorreatores para a remediação da contaminação mercurial.

A partir da organização do conjunto de isolados bacterianos obtidos, foi criada a "Coleção de Bactérias Resistentes a Poluentes Ambientais de Sistemas Aquáticos Brasileiros", que preserva atualmente 546 isolados de diferentes espécies bacterianas resistentes ao mercúrio no DSSA / ENSP / FIOCRUZ / RJ.

### 3.2. Áreas de Estudo

De 2005 a 2009, foram coletadas amostras de água de 30 pontos de coleta localizados em quatro diferentes regiões geográficas do Brasil: Sudeste (Rio de Janeiro), Norte (Rondônia), Centro-Oeste (Mato Grosso) e Sul (Rio Grande do Sul), como pode ser observado na Tabela 1.

No Rio de Janeiro, o sistema aquático selecionado foi a Baía de Guanabara, por receber esgotos domésticos e resíduos industriais, incluindo metais tóxicos, sem tratamento a partir de uma área densamente povoada [114]. As amostras foram coletadas entre os anos de 2005 e 2008, em locais da bacia hidrográfica altamente poluídos.

As amostras provenientes do estado de Rondônia foram coletadas em 2007, ao longo do rio Jamari, que é um afluente do rio Madeira, localizado nas terras baixas da Amazônia. A entrada de mercúrio no ecossistema amazônico, especificamente no rio Madeira, alcançou seu ponto máximo no final da década de 1980, no ápice da extração de ouro [115]. Outras coletas foram realizadas, no mesmo ano, na região da barragem da Usina Hidrelétrica de Samuel, localizada no município de Candeias do Jamari e na Floresta Nacional de Bom Futuro, considerada uma das unidades de conservação mais devastadas do país, com a presença de estradas, criações de gado e um núcleo urbano em seu território [116].

Em Mato Grosso, as coletas foram realizadas em 2007 e 2009, em pisciculturas localizadas nos municípios de Alta Floresta, onde existem relatos de atividade de garimpagem de ouro, e Paranaíta, onde o garimpo de ouro ocorreu intensamente no passado. Ambos os municípios estão localizados na região norte de Mato Grosso, no sul da região Amazônica e atualmente são considerados os produtores de peixes mais importantes da região [117].

No Rio Grande do Sul, as amostras foram coletadas em 2009 na Lagoa Mirin e na Lagoa dos Patos, em áreas poluídas por antigas atividades industriais próximas ao município de Rio Grande, considerado um polo portuário e industrial na região do extremo sul do Brasil [118].

Os locais de coleta selecionados para a obtenção de amostras de água nos sistemas aquáticos brasileiros (Figura 3) foram classificados de acordo com a existência de registros de atividades que gerassem a emissão de mercúrio em qualquer período da história, a partir da consulta em fontes bibliográficas. Assim, nas regiões Norte (Complexo do rio Madeira / Rondônia), Sudeste (Baía de Guanabara / Rio de Janeiro) e Centro-Oeste (Pisciculturas / Mato Grosso), os pontos de coleta foram classificados como "com histórico de contaminação por mercúrio", enquanto os pontos de coleta das regiões Norte (Represa de Samuel / Rondônia) e Sul (Lagoas Mirin e dos Patos / Rio Grande do Sul) foram categorizados como "sem histórico de contaminação mercurial".

A justificativa para a seleção de bactérias oriundas de ecossistemas muito distintos entre si sob diversos aspectos (geográficos, climáticos, ecológicos, impactos antropogênicos, níveis de contaminação / degradação ambiental e histórico de ocupação humana) foi o interesse em testar a hipótese da ubiquidade da presença de bactérias resistentes ao mercúrio em ecossistemas aquáticos.

**Tabela 1** – Relação dos Pontos de Coleta Selecionados para a Pesquisa de Bactérias Resistentes ao Mercúrio.

| Região Geográfica / Estado | Mês / Ano da Coleta | Ponto de Coleta / Sistema Aquático | |
|---|---|---|---|
| Sudeste / Rio de Janeiro | Novembro / 2005 | P1 | Rio São João de Meriti |
| | | P2 | Rio São João de Meriti |
| | | P3 | Rio Acari |
| | Junho / 2006 | P4 | Gragoatá |
| | | P5 | Boa Viagem |
| | | P6 | Entrada da Baía de Guanabara |
| | Março / 2008 | P6JW | Baía de Guanabara (espelho d'água) |
| | | P7JW | Baía de Guanabara (espelho d'água) |
| | | P24JW | Baía de Guanabara (espelho d'água) |
| | | P25JW | Baía de Guanabara (espelho d'água) |
| | | P27JW | Baía de Guanabara (espelho d'água) |
| Norte / Rondônia | Setembro / 2007 | P2 | Rio Jamari |
| | | P3 | Lago de Bom Futuro |
| | | P4 | Vila Bom Futuro |
| | Outubro / 2007 | P1 | Represa de Samuel |
| | | P2 | Represa de Samuel |
| Sul / Rio Grande do Sul | Março / 2009 | PDR | Rio Grande |
| | | PD | Rio Grande |
| | | OS | Rio Grande |
| | | PSG | Sangradouro |
| | | PAG | Arroio Grande |
| | | PLM | Lagoa Mirin |
| Centro-Oeste / Mato Grosso | Dezembro / 2007 | P3 | Paranaíta |
| | Abril / 2009 | P1 | Paranaíta |
| | | P2 | Paranaíta |
| | | P4 | Paranaíta |
| | | P5 | Paranaíta |
| | | P1 | Alta Floresta |
| | | P4 | Alta Floresta |
| | | P5 | Alta Floresta |

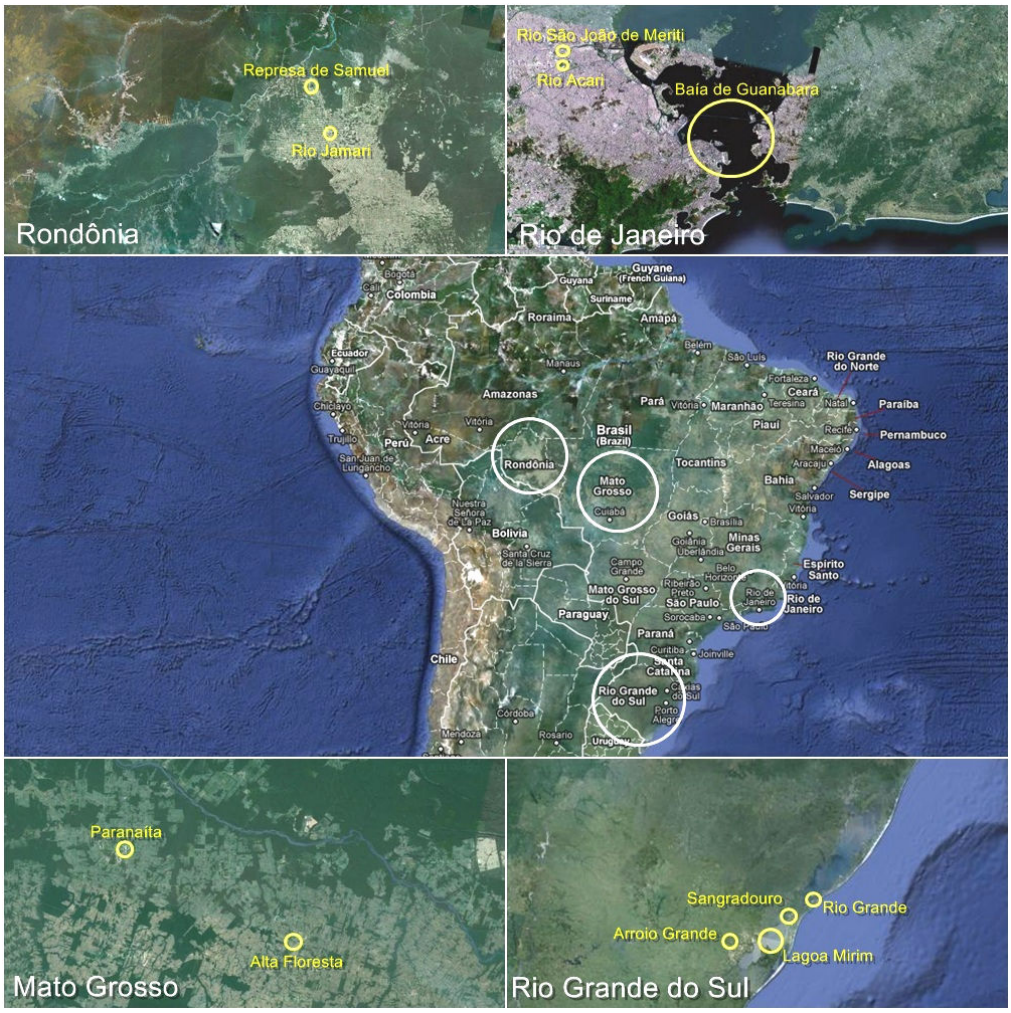



**Figura 3** – Locais Selecionados para a Coleta de Amostras de Água nos Estados do Rio de Janeiro, Rondônia, Mato Grosso e Rio Grande do Sul.

### 3.3. Metodologia de Coleta de Água

Para a coleta das amostras de água (100 mL), foram utilizadas seringas (60 mL) acopladas a suportes de filtração estéreis contendo uma membrana de éster celulose com porosidade de 0,22 µm e 47 mm de diâmetro (Swinnex®, Millipore, Estados Unidos), seguindo a metodologia proposta por Ramaiah e De [119], com algumas alterações.

Ao todo, foram coletadas 30 amostras de água superficial nos diversos sistemas aquáticos, cada amostra correspondendo a um dos pontos de coleta apresentados na Tabela 1.

Após a coleta, cada suporte de filtração - contendo a membrana onde as células bacterianas ficaram retidas - foi armazenado imediatamente em caixas térmicas de transporte e conservados em gelo reciclável até a chegada do material ao laboratório.

### 3.4. Seleção e Isolamento de Bactérias Resistentes ao Mercúrio Inorgânico

Com a chegada ao laboratório, os suportes de filtração foram abertos dentro da cabine de segurança biológica e a membrana foi removida assepticamente com o auxílio de uma pinça. Em seguida, cada membrana foi introduzida em tubos contendo 40 mL de Caldo Nutriente (Difco, Estados Unidos) acrescido de 5 μM de Hg (II) e incubada em estufa bacteriológica a 37 °C durante 18 – 24 horas.

Os meios de cultura (Anexo 1) foram escolhidos devido a sua combinação de macro e micronutrientes, que permite o cultivo de vários grupos bacterianos indistintamente. Com isso, procurou-se evitar que quaisquer grupos que necessitassem de maior quantidade de nutrientes para o seu cultivo fossem desfavorecidos.

A solução padrão de mercúrio inorgânico utilizada nos experimentos foi a "Mercury Standard for AAS TraceCERT®" (Fluka, Alemanha), que apresenta certificado de análise e composição estável, correspondente a 1,0 g Hg/L em 12 % (v/v) de ácido nítrico.

Estas condições experimentais foram definidas em experimentos prévios realizados por Vasconcellos [120], que revelaram que a adição de concentrações de mercúrio inferiores a 5 μM em Caldo Nutriente (Difco, Estados Unidos) mostra-se insuficiente para inibir o crescimento de bactérias sensíveis ao mercúrio, sugerindo uma baixa biodisponibilidade do metal nestas condições e resultando em falsos positivos.

A partir do crescimento bacteriano em Caldo Nutriente (Difco, Estados Unidos) acrescido com 5 μM de Hg (II), alíquotas de 5 μL de cada amostra foram semeadas individualmente em placas contendo Ágar Nutriente (Difco, Estados Unidos) acrescido com 5 μM de Hg (II), seguida de incubação em estufa bacteriológica a 37 °C durante 24 - 48 horas, para o isolamento de bactérias resistentes ao mercúrio.

Foram definidos critérios para seleção de colônias visando obter uma amostra representativa da população presente em cada placa semeada: a apresentação de aspectos macro-morfológicos diferentes (tamanho, bordos, elevação e pigmentação) e o número de colônias em cada placa semeada (3 a 5 colônias, dependendo da quantidade de crescimento).

### 3.5. Determinação da Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio ($CMI_{Hg}$)

Os níveis de resistência ao mercúrio foram estudados nas bactérias isoladas variando a concentração de mercúrio adicionada ao meio de cultura. Os isolados resistentes a 5 μM de mercúrio, foram inoculados em duplicata, na forma de *spots* com

volume igual a 2 μL, em placas de Ágar Nutriente (Difco, Estados Unidos) contendo concentrações de mercúrio que variaram entre 10 e 45 μM. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. A menor concentração de mercúrio capaz de inibir o crescimento da bactéria foi considerada como a concentração mínima inibitória ($CMI_{Hg}$).

A preparação do inóculo, a semeadura em placa e as condições de crescimento da cultura foram baseadas na metodologia proposta por Andrews [121].

Para este estudo, foram consideradas bactérias resistentes ao mercúrio aquelas capazes de crescer em placas de Ágar Nutriente (Difco, Estados Unidos) contendo pelo menos 20 μM Hg (II). Esta concentração foi definida com o objetivo de estudar amostras bacterianas altamente resistentes ao mercúrio. Entretanto, como não existe consenso entre os autores sobre qual seria essa concentração, variando de 2,5 μM [122,123,124] a 50 μM [59,119], optamos por um valor intermediário, que gerou uma amostragem com número adequado (n = 123) para o presente estudo.

### 3.6. Identificação das Bactérias Resistentes ao Mercúrio

A morfologia individual e as reações tintoriais são os principais critérios para iniciar a identificação e posterior classificação de bactérias.

Os isolados bacterianos foram submetidos ao método de coloração de Gram, conforme descrito no Anexo 2 e aquelas classificadas como Gram-negativas foram selecionadas para os experimentos posteriores. De acordo com a literatura, a composição do gene *merA* em bactérias resistentes ao mercúrio têm apresentado uma grande variabilidade até o momento. Porém, em bactérias Gram-negativas foi observada a conservação de uma sequência deste gene, que permite sua detecção.

A identificação das espécies bacterianas classificadas como Gram-negativas foi feita empregando-se os sistemas comerciais: BBL™ Crystal™ E / NF (Beckton, Dickinson and Company, Estados Unidos) e API® 20E (BioMérieux, França). Ambos são sistemas miniaturizados que incluem testes para fermentação, oxidação, degradação e hidrólise de vários substratos, destinados à identificação de bacilos aeróbios Gram-negativos fermentadores e não-fermentadores da glicose.

A descrição das provas que constituem os sistemas BBL™ Crystal™ E / NF (Beckton, Dickinson and Company, Estados Unidos) e API® 20E (BioMérieux, França) e os procedimentos técnicos empregados para identificar as bactérias isoladas estão detalhados no Anexo 3.

### 3.7. Preservação das Bactérias Resistentes ao Mercúrio

Todas os isolados bacterianos foram semeados sucessivamente em placas contendo Ágar Nutriente (Difco, Estados Unidos) acrescido com 5 μM de Hg (II) até que fosse verificada a ausência de contaminantes. Quando a pureza das amostras bacterianas foi confirmada, as mesmas foram estocadas em duplicata para utilização em experimentos posteriores. Um dos processos de conservação envolveu a utilização de Caldo Nutriente (Difco, Estados Unidos) acrescido de glicerol (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 20 % (v/v) e manutenção das amostras bacterianas em freezer com temperatura igual a -20 ºC e o segundo foi a utilização de Ágar Estoque e armazenamento em temperatura ambiente, como descrito no Anexo 1.

### 3.8. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Os antimicrobianos selecionados para utilização neste estudo foram aqueles descritos na literatura [35,80,81,82] como os mais comumente associados à resistência bacteriana ao mercúrio: Ampicilina, Ácido Nalidíxico, Gentamicina, Estreptomicina, Cloranfenicol, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Tetraciclina e Canamicina.

A determinação da resistência antimicrobiana das amostras bacterianas de origem ambiental resistentes ao mercúrio foi avaliada através da utilização da técnica da difusão de disco em placas (Anexo 4), descrita por Bauer *et al*. [125], seguindo as determinações apresentadas nas versões M2-A8 (2003) [126] e M100-S15 (2005) [127] do manual CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute – anteriormente denominado NCCLS). Estes documentos estão disponíveis no sítio eletrônico da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA / http://www.portal.anvisa.gov.br), que recomenda sua utilização rotineiramente nos laboratórios de análises clínicas.

Foram utilizados discos impregnados com os antimicrobianos: Ampicilina (10 μg), Ácido Nalidíxico (30 μg), Gentamicina (10 μg), Estreptomicina (10 μg), Cloranfenicol (30 μg), Sulfametoxazol-Trimetoprim (25 μg), Tetraciclina (30 μg) e Canamicina (30 μg), todos fornecidos pela Oxoid (Estados Unidos).

Também seguindo a recomendação do manual CLSI, utilizamos a cepa-padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 como amostra controle deste experimento.

### 3.9. Detecção do Gene *merA* no Genoma das Bactérias Resistentes ao Mercúrio Utilizando a Técnica de PCR

#### 3.9.1. Extração do DNA Genômico Bacteriano

As bactérias Gram-negativas identificadas que apresentaram $CMI_{Hg} \geq 20$ μM tiveram seu DNA genômico extraído utilizando o protocolo de lise térmica, segundo Sambrook *et al*. [128].

A partir do crescimento bacteriano puro em placas de Ágar Nutriente (Difco, Estados Unidos) contendo 5 μM de Hg, cinco colônias grandes foram transferidas para um microtubo contendo 1000 μL de água bidestilada estéril com o auxílio de uma alça bacteriológica. Em seguida, cada microtubo foi exposto a 100 ºC durante 10 minutos, em banho-maria. Após este tempo, os microtubos foram centrifugados a 12.000 g durante 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril. Os produtos da extração de DNA foram armazenados em freezer (-20 ºC) por no mínimo 30 minutos antes da realização da PCR.

#### 3.9.2. Metodologia para Detecção do Gene *merA*

O DNA genômico das bactérias Gram-negativas foi submetido à técnica de PCR tendo como alvo uma região conservada do gene *merA*, seguindo a metodologia descrita por Liebert *et al*. [56], com algumas modificações visando a otimização do ensaio quanto à sensibilidade e especificidade.

Foram utilizados dois protocolos de reação, na tentativa de reproduzir as condições de amplificação descritas por Liebert *et al*. [56]. De acordo com os autores, foi realizada uma variação da técnica de PCR, conhecida como "Hot-Start", onde a enzima DNA polimerase torna-se ativa apenas quando a reação atinge temperaturas elevadas, aumentando a especificidade da técnica.

Em um dos protocolos, foi utilizada a enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®, Estados Unidos), com temperatura de anelamento aumentada de 64 ºC para 70 ºC e os tempos de anelamento e extensão diminuídos, tornando a reação mais específica. No segundo protocolo foi empregada a enzima Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Estados Unidos), desenvolvida para PCR "Hot-Start".

Segundo Liebert *et al.* [56], o desenho dos iniciadores se baseou no alinhamento comum das sequências disponíveis do operon *mer* de bactérias Gram-negativas depositadas no *GenBank*, um banco de dados de livre acesso que contém sequências de

variados genes de interesse científico: A1 (5' ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT 3') e A5 (5' ACC ATC GTC AGG TAG GGG ACC AA 3'). De acordo com esse estudo original, estes iniciadores mostraram-se capazes de amplificar uma região conservada do gene *merA*, correspondente a 1234 pb, em 97 % das amostras bacterianas Gram-negativas resistentes ao mercúrio.

Em todas as reações de amplificação, realizadas em um termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemanha), foram incluídas as cepas-padrão *Escherichia coli* ATCC 35218 $Hg^R$ e *Escherichia coli* ATCC 23724 $Hg^S$ como controles positivo e negativo, respectivamente.

### 3.9.3. Parâmetros da PCR Utilizando a Enzima Taq DNA Polimerase Recombinante

Para a execução deste protocolo, um tubo de reação continha 30 pmol de cada um dos iniciadores (A1 e A5), 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de $MgCl_2$ e 1,25 U de Taq DNA Polimerase recombinante (Invitrogen®, Estados Unidos), num volume final de 50 µL. As condições de amplificação utilizadas foram: 1 ciclo de 95 °C / 2 minutos, 70 °C / 20 segundos, 72 °C / 1 minuto; seguido por 29 ciclos de 95 °C / 1 minuto, 70 °C / 20 segundos, 72 °C / 1 minuto; e finalizando com 1 ciclo de 72 °C / 5 minutos.

### 3.9.4. Parâmetros da PCR Utilizando a Enzima Platinum® Taq DNA Polimerase

A composição da solução de reação apresentou apenas uma diferença em relação ao protocolo anterior, a adição de 1,25 U de Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, Estados Unidos). As condições de amplificação foram as mesmas definidas por Liebert *et al*. [56]: 1 ciclo de 95 °C / 2 minutos, 64 °C / 2 minutos, 72 °C / 3 minutos; seguido por 29 ciclos de 95 °C / 1 minuto, 64 °C / 2 minutos, 72 °C / 3 minutos; e finalizando com 1 ciclo de 72 °C / 5 minutos.

### 3.9.5. Eletroforese do DNA

Para a visualização dos fragmentos de DNA amplificados, 10 µL de cada produto de amplificação e 5 µL do padrão de peso molecular "DNA Ladder 1 Kb" (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) foram aplicados individualmente nos poços de um gel de agarose (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) preparado com concentração igual a 1 % (peso / volume) e Tampão TBE 0,5 X. Após a separação dos fragmentos utilizando 90 volts durante 3 horas, o gel foi submetido à coloração utilizando uma solução de brometo de etídeo (0,5 mg / mL) para a visualização dos fragmentos de DNA. Em

seguida, a presença dos fragmentos foi visualizada empregando um sistema automatizado de fotodocumentação (UVItec, Reino Unido) e seu peso molecular foi estimado a partir da comparação com os resultados apresentados pelo padrão "DNA Ladder 1 Kb" (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

### 3.10. Purificação e Quantificação do DNA

Para o sequenciamento do gene *merA* detectado nos isolados bacterianos, os produtos de PCR foram eluídos e purificados utilizando-se o "Illustra GFX DNA PCR and Gel Band Purification Kit" (GE Healthcare, Reino Unido), seguindo os procedimentos descritos no Anexo 5.

A quantificação do DNA purificado baseou-se na comparação visual da intensidade da fluorescência apresentada pelas bandas do padrão com a fluorescência exibida por cada amostra de DNA purificado. Foram encaminhadas para o sequenciamento as amostras de DNA que apresentaram fluorescência correspondente a 150-200 ng, faixa ideal de concentração do DNA para gerar resultados de boa qualidade no sequenciamento.

Resumidamente, após a purificação, o DNA foi quantificado através da utilização do padrão "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen®, Estados Unidos), uma mistura composta por fragmentos de DNA com 2000, 1200, 800, 400, 200 e 100 pb que resulta em bandas de DNA contendo 200, 120, 80, 40, 20 e 10 ng de DNA no gel de agarose após a realização da eletroforese.

Para a quantificação, foi preparado um gel de agarose (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 2 % (peso / volume) com tampão TBE 0,5 X. Em cada slot do gel foram aplicados 4 µL do "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen®, Estados Unidos) e o mesmo volume de cada amostra purificada, separadamente. Após a realização da eletroforese utilizando 70 volts durante 2 horas, o gel de agarose foi corado com uma solução de brometo de etídeo (0,5 mg / mL) e visualizado em sistema automatizado de fotodocumentação (UVItec, Reino Unido).

### 3.11. Sequenciamento do DNA

Para o sequenciamento dos fragmentos do gene *merA* detectados nas bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio foi utilizado o método desenvolvido por Sanger e colaboradores [129].

O sequenciamento das amostras foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA PDTIS / FIOCRUZ – RJ utilizando o equipamento "48-Capilar ABI3730 DNA Analyzer" com capilares de 36 cm e polímero POP7™ (Applied Biosystems, Estados Unidos). Os produtos de PCR foram marcados utilizando-se 3,2 pmol dos iniciadores A1 (F) e A5 (R), separadamente e 2,5 µL do reagente "ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems, Estados Unidos) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador "GeneAmp® PCR System 9700" (Applied Biosystems, Estados Unidos) com 40 ciclos de 94 ºC por 10 segundos, 50 ºC por 5 segundos e 60 ºC por 4 minutos. Após a marcação, as amostras foram purificadas pela precipitação com Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems, Estados Unidos) e injetadas eletronicamente no seqüenciador automático. Os procedimentos técnicos estão descritos detalhadamente no Anexo 6.

### 3.12. Interpretação dos Dados Gerados pelo Sequenciamento

As ferramentas selecionadas para interpretar os dados resultantes do sequenciamento de DNA foram os programas BLAST ("Basic Local Alignment Sequence Tool") e T-COFFEE (Tree-based Consistency Objective Function For Alignment Evaluation). Para os alinhamentos locais foi utilizado o BLAST [130], um programa otimizado para a pesquisa do maior grau de similaridade entre a sequência em estudo e sequências depositadas em bancos de dados de livre acesso. Para executar os alinhamentos múltiplos, utilizamos o T-COFFEE [131], um programa que gera resultados consistentes e acurados [132,133] e, diferente dos outros, reconhece características que envolvem as sequências como um todo, através do alinhamento global, assim como especificidades das sequências, a partir do alinhamento local.

## 4.1. Presença de Bactérias Gram-negativas Resistentes ao Mercúrio nos Sistemas Aquáticos

Conforme mencionado anteriormente, as coletas de amostras de água foram realizadas em 4 estados representantes de diferentes regiões geográficas brasileiras (Rio de Janeiro – Região Sudeste, Rondônia – Região Norte, Mato Grosso – Região Centro-Oeste e Rio Grande do Sul – Região Sul), entre os anos de 2005 e 2009. Os pontos de coleta foram classificados em categorias, de acordo com o impacto antropogênico predominante ou a atividade desenvolvida no local: "efluentes domésticos e industriais", "efluentes de mineração", "represa" e "pisciculturas".

Como resultado, 123 isolados de bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio foram obtidos a partir de 30 amostras de água coletadas, sendo possível isolar bactérias resistentes ao mercúrio de todos os pontos de coleta, independente do histórico de contaminação por mercúrio.

Do total de isolamentos, 57 (46 %) amostras bacterianas foram isoladas de pontos de coleta afetados pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais localizados no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul (Tabela 2). A partir das coletas realizadas na bacia da Baía de Guanabara, considerada como o complexo estuarino mais importante para a produtividade da pesca na costa sudeste do Brasil e receptora de esgotos domésticos e resíduos industriais, incluindo metais tóxicos, sem tratamento a partir de uma área densamente povoada [114], foram coletadas 11 amostras de água que resultaram em 48 (39 %) isolados bacterianos resistentes ao mercúrio. As coletas foram realizadas em novembro de 2005 (3 amostras; 25 isolados), junho de 2006 (3 amostras; 6 isolados) e março de 2008 (5 amostras; 17 isolados). No Rio Grande do Sul, em cujas regiões estudadas não foram encontrados registros históricos que demonstrassem a utilização de grandes quantidades de mercúrio no passado, foi realizada apenas uma coleta de 6 amostras de água, em março de 2009, que resultou em 9 isolados bacterianos. O isolamento de bactérias resistentes ao mercúrio em todos os pontos de coleta reforça a suspeita de Fragomeni *et al.* [101] de que existiriam atividades produtivas artesanais e industriais na região que utilizavam quantidades importantes de compostos de mercúrio em seus processos.

Em Rondônia, foram coletadas 5 amostras de água que permitiram a obtenção de 52 (42 %) isolados bacterianos, dos quais 37 isolados foram provenientes de 3 amostras

de água coletadas em pontos de coleta afetados pelo lançamento de efluentes de mineração de cassiterita e 15 isolados foram oriundos de 2 amostras de água coletadas em represa, nos meses de setembro e outubro de 2007, respectivamente. Naquela região, os sistemas aquáticos são importantes fontes de alimentos para a população local, cuja dieta é baseada no consumo de peixes, sendo sua principal fonte de proteínas [134].

Em Mato Grosso, das 8 amostras de água coletadas em "pisciculturas" foram obtidos 14 isolados bacterianos resistentes, tendo sido 1 isolado de 1 amostra de água coletada em dezembro de 2007 e 13 isolados a partir de 7 amostras de água obtidas em abril de 2009. Isto sugere que o efeito seletivo exercido pela contaminação mercurial ocorrida no passado permanece atualmente na comunidade microbiana local, através da presença de bactérias resistentes ao mercúrio nestas áreas.

Dos 123 isolados bacterianos obtidos, a maior parte (42 %) foi proveniente das 5 amostras de água coletadas em Rondônia, principalmente de pontos de coleta afetados pelo lançamento dos efluentes de mineração, embora tenha sido coletado naquela região o menor número de amostras de água deste estudo. O menor número de isolamentos de bactérias resistentes foi observado nas amostras de água coletadas no Rio Grande do Sul (7 %) como pode ser observado na Tabela 2.

**Tabela 2** – Número de Amostras de Água Coletadas e de Isolados Bacterianos de acordo com a Região Geográfica de Origem.

| Região Geográfica | Atividade / Impacto Antropogênico Predominante | Período da Coleta | Nº de Amostras de Água | Total de Amostras de Água | Nº de Isolados | Percentual de Isolados por Estado |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sudeste (RJ) | Efluentes domésticos e industriais | Novembro 2005 | 3 | 11 (37 %) | 25 | 48 (39 %) |
| | | Junho 2006 | 3 | | 6 | |
| | | Março 2008 | 5 | | 17 | |
| Sul (RS) | Efluentes domésticos e industriais | Março 2009 | 6 | 6 (20 %) | 9 | 9 (7 %) |
| Norte (RO) | Efluentes de mineração | Setembro 2007 | 3 | 5 (17 %) | 37 | 52 (42 %) |
| | Represa | Outubro 2007 | 2 | | 15 | |
| Centro-Oeste (MT) | Pisciculturas | Dezembro 2007 | 1 | 8 (27 %) | 1 | 14 (11 %) |
| | Pisciculturas | Abril 2009 | 7 | | 13 | |
| **Total** | | | | **30 (100 %)** | **123** | **123 (100 %)** |

A maioria das bactérias isoladas (80 %) foi oriunda dos ecossistemas aquáticos dos estados de Rondônia (áreas afetadas pelo lançamento de efluentes de mineração de cassiterita), Mato Grosso (pisciculturas) e Rio de Janeiro (áreas afetadas pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais), regiões que, de acordo com a literatura, apresentam um histórico conhecido de contaminação mercurial. De acordo com alguns autores [59,135], a presença de bactérias resistentes em regiões onde a emissão do metal foi interrompida sugere que as formas solúveis do mercúrio continuam disponíveis nas áreas estudadas e esta exposição deve interferir na resposta adaptativa das bactérias, estimulando o desenvolvimento de mecanismos de resistência.

Por outro lado, a presença de bactérias resistentes nos locais que não apresentam um histórico conhecido de contaminação mercurial sugere que a eficiência do transporte atmosférico do Hg pode estar possibilitando sua presença em ecossistemas aquáticos onde fontes de emissão deste poluente são desconhecidas, e consequentemente esta presença estaria selecionando bactérias resistentes ao Hg na comunidade bacteriana local. Outra possível explicação é que também existam fontes de Hg nos ambientes que não são conhecidas ou descritas na literatura. De qualquer forma, estes dados reforçam a hipótese da ubiquidade da contaminação ambiental pelo mercúrio, reconhecido como poluente global [136,137].

### 4.2. Nível de Resistência ao Mercúrio Inorgânico Apresentado pelas Bactérias

As amostras bacterianas Gram-negativas isoladas das 4 regiões geográficas (n = 123) foram avaliadas para a determinação da Concentração Mínima Inibitória de mercúrio ($CMI_{Hg}$). Foi observada uma relação inversa entre as concentrações de mercúrio adicionadas ao meio de cultura e o número de isolados bacterianos resistentes, como pode ser observado na Tabela 3.

A maioria dos isolados (n = 119; 97 %) apresentou $CMI_{Hg}$ igual a 20 µM. Este nível de resistência foi observado em todos os isolados oriundos do Rio Grande do Sul (n = 9) e de Rondônia (n = 52), 96 % dos isolados do Rio de Janeiro (n = 46) e 86 % dos isolados de Mato Grosso (n = 12). Apenas 4 isolados apresentaram valores de $CMI_{Hg}$ superiores a 20 µM e todos foram oriundos de amostras coletadas de regiões historicamente contaminadas com mercúrio no passado. Um dos isolados apresentou $CMI_{Hg}$ igual a 25 µM e foi oriundo do Rio de Janeiro, enquanto os outros 3 isolados apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 30 µM, sendo 1 oriundo do Rio de Janeiro e 2 de Mato Grosso.

Quando uma bactéria apresenta altos níveis de resistência, acredita-se que provavelmente foi exposta a altas concentrações do metal pesado e, possivelmente, por um tempo prolongado [138]. Portanto, estes microrganismos poderiam ser considerados indicadores biológicos de poluição por metais tóxicos no ambiente e indicadores do impacto do metal na comunidade bacteriana destes ecossistemas.

**Tabela 3** – Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio ($CMI_{Hg}$) Apresentada pelas Bactérias Isoladas.

| Região Geográfica | Atividade / Impacto Antropogênico Predominante | $CMI_{Hg}$ | Percentual de Isolados por Estado | Total |
|---|---|---|---|---|
| Norte (RO) | Efluentes de mineração e Represa | 20 μM | 52 (100 %) | 119 |
| Sudeste (RJ) | Efluentes domésticos e industriais | 20 μM | 46 (96 %) | |
| Centro-Oeste (MT) | Pisciculturas | 20 μM | 12 (86 %) | |
| Sul (RS) | Efluentes domésticos e industriais | 20 μM | 9 (100 %) | |
| Sudeste (RJ) | Efluentes domésticos e industriais | 25 μM | 1 (2 %) | 1 |
| Centro-Oeste (MT) | Pisciculturas | 30 μM | 2 (14 %) | 3 |
| Sudeste (RJ) | Efluentes domésticos e industriais | 30 μM | 1 (2 %) | |
| **Total** | | | | **123** |

### 4.3. Características Bioquímicas das Bactérias Resistentes ao Mercúrio

Do total de 123 isolados bacterianos, foi possível classificar 113 isolados quanto ao gênero ou espécie. As bactérias classificadas inicialmente como bastonetes ou cocobacilos Gram-negativos foram submetidas a testes bioquímicos através da utilização não concomitante de dois sistemas miniaturizados de identificação disponíveis comercialmente. Ao final, 57 isolados bacterianos (46 %) foram identificados pelo sistema BBL™ Crystal™ Enteric / Nonfermenter ID Kit (Beckton, Dickinson and Company, Estados Unidos) e 56 (46 %) pelo sistema API® 20E (BioMérieux, França), enquanto os outros 10 isolados (8 %) apresentaram identificação inconclusiva em ambos os sistemas. Estes isolados não identificados foram oriundos do Rio de Janeiro (n = 5), Rondônia (n = 2) e Mato Grosso (n = 3), conforme apresentado na Tabela 4.

Avaliando o número total de bactérias de origem ambiental identificadas pelos dois sistemas bioquímicos (92 %), cujos desenvolvimentos foram direcionados para o diagnóstico de bactérias clinicamente relevantes, pode-se considerar o resultado bastante satisfatório. Porque os testes de controle de qualidade divulgados pelos fabricantes apontam um índice de sucesso próximo a 90 % para a identificação de bactérias Gram-negativas de origem clínica.

É importante ressaltar que muitos microrganismos de origem ambiental não apresentam crescimento quando cultivados em meios de cultura sintéticos e os métodos fenotípicos de identificação bacteriana somente podem ser empregados em amostras cultivadas *in vitro* que exibam características metabólicas de acordo com os padrões observados nos gêneros e espécies já descritos. Deste modo, considera-se que os microrganismos cultiváveis e identificáveis devem representar uma pequena fração da diversidade bacteriana presente no ambiente [37,62,139].

Como resultado da primeira coleta realizada no Rio de Janeiro, em novembro de 2005, foram isoladas 25 amostras bacterianas dos rios São João de Meriti e Acari, que recebem águas residuais domésticas não tratadas. Destas, foi possível identificar 22 isolados (88 %): *Enterobacter cloacae* (n = 6; 27 %); *Klebsiella pneumoniae* (n = 5; 23 %); *Aeromonas* sp. (n = 2; 9 %); *Vibrio metschnikovii* (n = 2; 9 %); *E. coli* (n = 1; 4,5 %); *Enterobacter asburiae* (n = 1; 4,5 %); *Pseudomonas putida* (n = 1; 4,5 %); *Raoultella terrigena* (n = 1; 4,5 %); *Leclercia adecarboxylata* (n = 1; 4,5 %); *Enterobacter* sp. (n = 1; 4,5 %) e *Serratia* sp. (n = 1; 4,5 %).

Ainda no Rio de Janeiro, foram isoladas 6 amostras bacterianas Gram-negativas na segunda coleta, em junho de 2006, das quais 5 (83 %) foram identificadas: *E. cloacae* (n=1; 20 %); *K. pneumoniae* (n=1; 20 %); *Stenotrophomonas maltophila* (n=1; 20 %); *Enterobacter aerogenes* (n=1; 20 %) e *Sphingomonas paucimobilis* (n=1; 20 %). Na última coleta realizada nesta região, em março de 2008, 17 isolados foram obtidos, sendo que 16 (94 %) destes foram identificados: *E. cloacae* (n = 6; 37,5 %); *E. coli* (n = 4; 25 %); *K. pneumoniae* (n = 2; 12,5 %); *Enterobacter* sp. (n = 1; 6 %); *P. putida* (n = 1; 6 %); *Klebsiella oxytoca* (n = 1; 6 %) e *Serratia odorifera* (n = 1; 6 %).

**Tabela 4** – Espécies Bacterianas Isoladas nas Diferentes Regiões Geográficas Incluídas no Estudo.

| Região Geográfica | Período da Coleta | Espécies Bacterianas Identificadas |
|---|---|---|
| Sudeste (RJ) | novembro / 2005 | *Enterobacter cloacae* (6*)<br>*Klebsiella pneumoniae* (3*+2**)<br>*Aeromonas* sp. (1*+1**)<br>*Vibrio metschnikovii* (2*)<br>*Escherichia coli* (1*)<br>*Enterobacter asburiae* (1*)<br>*Pseudomonas putida* (1*)<br>*Raoultella terrigena* (1*)<br>*Leclercia adecarboxylata* (1*)<br>*Enterobacter* sp. (1*)<br>*Serratia* sp. (1**)<br>identificação inconclusiva (3) |
| | junho / 2006 | *Enterobacter cloacae* (1**)<br>*Klebsiella pneumoniae* (1*)<br>*Stenotrophomonas maltophila* (1**)<br>*Enterobacter aerogenes* (1*)<br>*Sphingomonas paucimobilis* (1*)<br>identificação inconclusiva (1) |
| | março / 2008 | *Enterobacter cloacae* (1*+5**)<br>*Escherichia coli* (1*+3**)<br>*Klebsiella pneumoniae* (2**)<br>*Enterobacter* sp. (1**)<br>*Pseudomonas putida* (1*)<br>*Klebsiella oxytoca* (1**)<br>*Serratia odorifera* (1**)<br>identificação inconclusiva (1) |

(continua)

**Tabela 4** – Espécies Bacterianas Isoladas nas Diferentes Regiões Geográficas Incluídas no Estudo.

(continuação)

| Região Geográfica | Período da Coleta | Espécies Bacterianas Identificadas |
|---|---|---|
| Norte (RO) | setembro / 2007 | *Enterobacter cloacae* (3*+17**)<br>*Klebsiella pneumoniae* (1*+4**)<br>*Serratia* sp. (1*+2**)<br>*Raoultella ornithinolytica* (2**)<br>*Enterobacter* sp. (2*)<br>*Burkholderia cepacia* (1*)<br>*Acinetobacter baumannii* (1*)<br>*Pseudomonas* sp. (1**)<br>identificação inconclusiva (2) |
| | outubro / 2007 | *Pantoea* sp. (1*+10**)<br>*Enterobacter cloacae* (1*)<br>*Kluyvera cryocrescens* (1*)<br>*Kluyvera* sp. (1*)<br>*Serratia* sp. (1**) |
| Centro-Oeste (MT) | dezembro / 2007 | Identificação inconclusiva (1) |
| | abril / 2009 | *Klebsiella pneumoniae* (4*)<br>*Enterobacter cloacae* (4*)<br>*Acinetobacter baumannii* (2*)<br>*Pantoea* sp. (1*)<br>identificação inconclusiva (2) |
| Sul (RS) | março / 2009 | *Klebsiella pneumoniae* (9*) |

* identificação utilizando o sistema Crystal™;

** identificação utilizando o sistema API®.

Foram isoladas 48 amostras bacterianas ao final das coletas realizadas no Rio de Janeiro. Os gêneros bacterianos mais observados foram *Enterobacter* sp. (35 %), *Klebsiella* sp. (19 %) e a espécie *E. coli* (10 %), totalizando 64,5 % de todos os isolamentos de bactérias resistentes ao mercúrio realizados nos pontos de coleta do estado. O gênero bacteriano mais isolado nas três coletas foi *Enterobacter* sp. Em 2005, o percentual de isolamento de *Enterobacter* sp. capazes de crescer na presença de mercúrio (20 μM) foi igual a 29 % e nos anos seguintes o percentual apresentou elevação, com 43 % no ano de 2006 e 41 % em 2008.

Das amostras de água coletadas em março de 2009 no Rio Grande do Sul, de áreas influenciadas pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais, foram obtidos 9 isolados bacterianos Gram-negativos capazes de crescer na presença de 20 μM de mercúrio adicionado ao meio de cultura e todos foram identificados como *K. pneumoniae*.

Dos pontos de coleta caracterizados como áreas afetadas pelo lançamento de efluentes de mineração de cassiterita, todos localizados em Rondônia, foram isoladas 37 amostras bacterianas Gram-negativas em setembro de 2007. Deste total, 35 amostras foram identificadas: *E. cloacae* (n = 20; 57 %); *K. pneumoniae* (n = 5; 14 %); *Serratia* sp. (n = 3; 9 %); *Raoultella ornithinolytica* (n = 2; 6 %); *Enterobacter* sp. (n = 2; 6 %); *Burkholderia cepacia* (n = 1; 3 %); *Acinetobacter baumannii* (n = 1; 3 %) e *Pseudomonas* sp. (n = 1; 3 %). Ainda em Rondônia, como resultado das coletas realizadas em outubro de 2007 na Represa de Samuel, foram isoladas 15 amostras bacterianas Gram-negativas, as quais foram identificadas como *Pantoea* sp. (n = 11; 73 %); *E. cloacae* (n = 1; 7 %); *Kluyvera cryocrescens* (n = 1; 7 %); *Kluyvera* sp. (n = 1; 7 %) e *Serratia* sp. (n = 1; 7 %).

Ao final, com os resultados obtidos a partir das duas coletas realizadas em Rondônia, podemos observar que foram isoladas 52 amostras bacterianas, distribuídas entre os gêneros: *Enterobacter* sp. (n = 23; 44 %); *Pantoea* sp. (n = 11; 21 %); *Klebsiella* sp. (n = 5; 10 %); *Serratia* sp. (n = 4; 8 %); *Raoultella* sp. (n = 2; 4 %); *Kluyvera* sp. (n = 2; 4 %); *Burkholderia* sp. (n = 1; 2 %); *Acinetobacter* sp. (n = 1; 2 %); *Pseudomonas* sp. (n = 1; 2 %) e dois isolados (4 %) com identificação taxonômica inconclusiva ao final dos testes bioquímicos.

Em Rondônia, as duas coletas aconteceram em períodos de tempo próximos, nos meses de setembro e outubro de 2007, porém em regiões muito diferentes. Como resultado de isolamento de bactérias resistentes ao mercúrio nesta região geográfica,

obtivemos o predomínio de *Enterobacter* sp. (59,5 %) na primeira coleta e *Pantoea* sp. (73 %) na segunda coleta. Ao final das duas coletas, os gêneros bacterianos mais observados foram *Enterobacter* sp. (44 %), *Pantoea* sp. (21 %) e *Klebsiella* sp. (10 %), totalizando 75 % de todos os isolamentos de bactérias resistentes ao mercúrio realizados nos pontos de coleta do estado.

Das coletas realizadas em pisciculturas localizadas no estado de Mato Grosso, foram isoladas 14 amostras bacterianas Gram-negativas. Em dezembro de 2007, 1 amostra bacteriana foi isolada, porém não foi identificada devido à apresentação de resultados inconclusivos nos testes bioquímicos de ambos os kits. Em abril de 2009, 13 amostras bacterianas foram isoladas e, destas, 11 foram identificadas: *K. pneumoniae* (n = 4; 36 %); *E. cloacae* (n = 4; 36 %); *A. baumannii* (n = 2; 18 %) e *Pantoea* sp. (n = 1; 9 %).

Em Mato Grosso, a maioria dos isolados bacterianos ao final das duas coletas foram representantes dos gêneros *Enterobacter* sp. (29 %); *Klebsiella* sp. (29 %) e *Acinetobacter* sp. (14 %), totalizando 71,5 % das bactérias identificadas a partir das amostras de água coletadas na região.

Podemos destacar a diversidade bacteriana de isolados do Rio de Janeiro, onde foram identificadas algumas amostras de *E. coli*, *Aeromonas* sp., *V. metschnikovii*, *L. adecarboxylata*, *S. maltophila* e *S. paucimobilis*, as quais não foram obtidas de nenhuma outra região geográfica. Por outro lado, embora apresentando menor diversidade bacteriana, as coletas realizadas em Rondônia resultaram no isolamento de *B. cepacia* e *Kluyvera* sp., também não encontradas nos outros ecossistemas aquáticos estudados, como pode ser observado na Tabela 5.

Observamos que o gênero bacteriano mais prevalente nas amostras coletadas no Rio de Janeiro e Rondônia foi *Enterobacter* sp. Resultado semelhante foi obtido ao final das coletas realizadas em Mato Grosso, onde foram prevalentes os gêneros *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp., e no Rio Grande do Sul, onde foram isoladas apenas *K. pneumoniae*. Independente dos pontos de coleta apresentarem histórico de contaminação por esgoto doméstico observou-se que as enterobactérias, representadas principalmente pelas espécies *E. cloacae* e *K. penumoniae* foram as bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio mais comumente isoladas nos diferentes ecossistemas aquáticos (Gráfico 1). O gênero de enterobactérias *Pantoea* sp. apresentou alto índice de isolamento nas coletas realizadas na Represa de Samuel, em Rondônia, o que pode ser

justificado por sua presença frequente em sementes, superfícies de plantas, do solo e da água, de acordo com Rezzonico *et al*. [140].

Podemos observar que não houve diferença significativa quanto aos gêneros bacterianos isolados em maior número nos locais amostrados, a maioria representante da família Enterobacteriaceae, embora os pontos de coleta apresentassem características bastante distintas. É possível que os resultados obtidos não reflitam a diversidade bacteriana dos ecossistemas aquáticos estudados, pois os procedimentos de cultivo e isolamento adotados podem ter beneficiado o isolamento dos grupos bacterianos identificados com maior frequência.

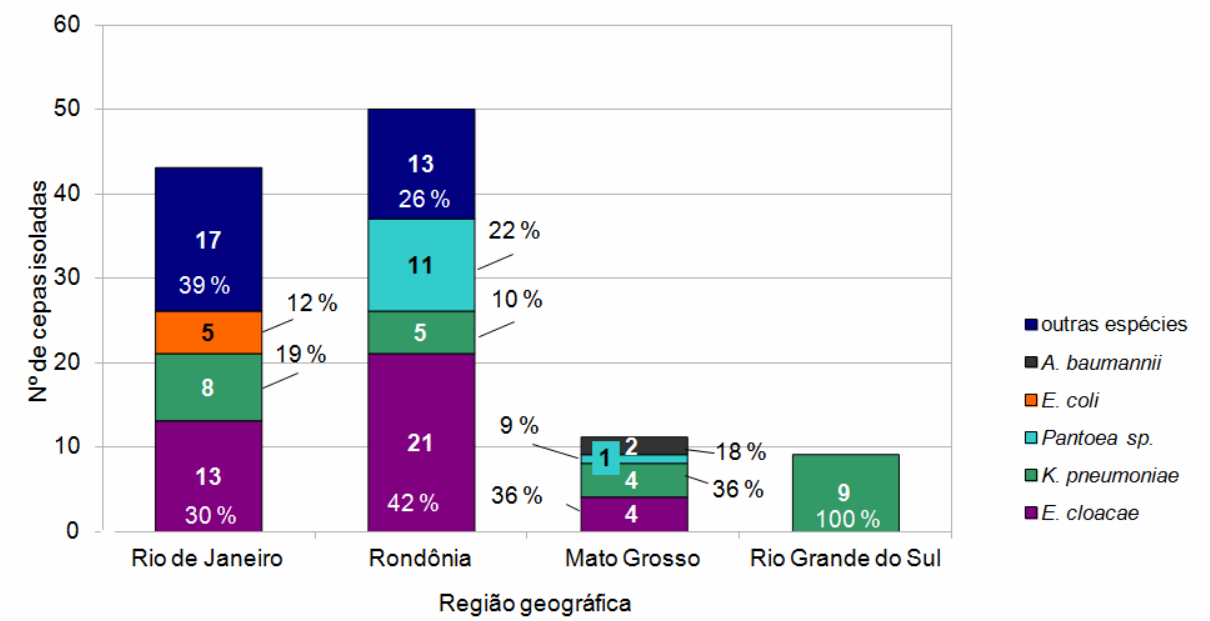
**Tabela 5** – Relação de Espécies Bacterianas Identificadas de acordo com a Origem.

| **Região Geográfica** | **Atividade / Impacto Antropogênico Predominante** | **Período da Coleta** | **Isolados Bacterianos Identificados** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | **Gêneros/Espécies** | **Nº (%)** | **Nº / coleta** | **Nº / região** |
| Sudeste (RJ) | Efluentes domésticos e industriais | Novembro 2005 | *E. cloacae* | 6 (27) | 22 | |
| | | | *K. pneumoniae* | 5 (23) | | |
| | | | *Aeromonas* sp. | 2 (9) | | |
| | | | *V. metschnikovii* | 2 (9) | | |
| | | | *E. coli* | 1 (4,5) | | |
| | | | *E. asburiae* | 1 (4,5) | | |
| | | | *P. putida* | 1 (4,5) | | |
| | | | *R. terrigena* | 1 (4,5) | | |
| | | | *L. adecarboxylata* | 1 (4,5) | | |
| | | | *Enterobacter* sp. | 1 (4,5) | | |
| | | | *Serratia* sp. | 1 (4,5) | | |
| | | Junho 2006 | *E. cloacae* | 1 (20) | 5 | |
| | | | *K. pneumoniae* | 1 (20) | | |
| | | | *S. maltophila* | 1 (20) | | |
| | | | *E. aerogenes* | 1 (20) | | |
| | | | *S. paucimobilis* | 1 (20) | | |
| | | | | | (continua) | |

**Tabela 5** – Relação de Espécies Bacterianas Identificadas de acordo com a Origem.
(continuação)

| Região Geográfica | Atividade / Impacto Antropogênico Predominante | Período da Coleta | Isolados Bacterianos Identificados | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Gêneros/Espécies | Nº (%) | Nº / coleta | Nº / região |
| Sudeste (RJ) | Efluentes domésticos e industriais | Março 2008 | *E. cloacae* | 6 (37,5) | 16 | 43 |
| | | | *E. coli* | 4 (25) | | |
| | | | *K. pneumoniae* | 2 (12,5) | | |
| | | | *Enterobacter* sp. | 1 (6) | | |
| | | | *P. putida* | 1 (6) | | |
| | | | *K. oxytoca* | 1 (6) | | |
| | | | *S. odorifera* | 1 (6) | | |
| Norte (RO) | Efluentes de mineração | Setembro 2007 | *E. cloacae* | 20 (57) | 35 | 50 |
| | | | *K. pneumoniae* | 5 (14) | | |
| | | | *Serratia* sp. | 3 (9) | | |
| | | | *R. ornithinolytica* | 2 (6) | | |
| | | | *Enterobacter* sp. | 2 (6) | | |
| | | | *B. cepacia* | 1 (3) | | |
| | | | *A. baumannii* | 1 (3) | | |
| | | | *Pseudomonas* sp. | 1 (3) | | |
| | Represa | Outubro 2007 | *Pantoea* sp. | 11 (73) | 15 | |
| | | | *E. cloacae* | 1 (7) | | |
| | | | *K. cryocrescens* | 1 (7) | | |
| | | | *Kluyvera* sp. | 1 (7) | | |
| | | | *Serratia* sp. | 1 (7) | | |
| Centro-Oeste (MT) | Pisciculturas | Abril 2009 | *K. pneumoniae* | 4 (36) | 11 | 11 |
| | | | *E. cloacae* | 4 (36) | | |
| | | | *A. baumannii* | 2 (18) | | |
| | | | *Pantoea* sp. | 1 (9) | | |
| Sul (RS) | Efluentes domésticos e industriais | Março 2009 | *K. pneumoniae* | 9 (100,0) | 9 | 9 |
| **Total** | | | | | | **113** |

**Gráfico 1** – Principais Gêneros e Espécies Bacterianos Identificados nos Ecossistemas Aquáticos.




### 4.4. Significado da Predominância do Isolamento de Enterobactérias Resistentes ao Mercúrio nos Sistemas Aquáticos

A partir da classificação bioquímica, observou-se o predomínio de bactérias pertencentes aos grupos dos coliformes fecais (*E. coli*, *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp.) e coliformes totais, como *Serratia* sp. Esses resultados indicam a presença de microrganismos indicadores de poluição fecal recente por águas residuais e excretas de origem animal ou humana e o efeito negativo da poluição sobre a biodiversidade dos sistemas aquáticos estudados.

As bactérias do grupo dos coliformes fecais são utilizadas para a avaliação das condições sanitárias da água, como indicadores de poluição fecal, devido a sua presença no trato gastrintestinal de humanos e de outros animais de sangue quente e sua eliminação em grande número pelas fezes, que podem conter microrganismos patogênicos e tornarem-se veículos para transmissão de doenças [34].

A aquisição da resistência por estas bactérias pode ser resultante da pressão seletiva exercida pelos contaminantes oriundos da liberação de efluentes domésticos e resíduos industriais nos ecossistemas, fazendo com que representem um risco real para a saúde pública através do contato direto da população local com esses sistemas aquáticos.

Além disso, a presença ubíqua de enterobactérias resistentes ao mercúrio nos diferentes ecossistemas estudados, corroborando outros estudos da literatura realizados

no Egito [139], Turquia [141] e Canadá [142], sugere a importância da transferência gênica horizontal na ecologia de comunidades microbianas adaptadas ao ambiente devido à reconhecida capacidade de transferência de elementos genéticos móveis por enterobactérias, os quais podem conferir resistência a antibióticos e metais tóxicos simultaneamente.

Como discutido por Goni-Urriza *et al*. [143], as águas dos rios são o principal destinatário dos poluentes presentes nos efluentes dos esgotos urbanos. Considerando que os rios são uma das principais fontes de água para consumo humano e animal, essa poluição representa um grave problema de saúde pública, além de contribuir para a seleção, a manutenção e a disseminação de bactérias resistentes a esses poluentes no ambiente aquático.

### 4.5. Variações do Metabolismo Bacteriano frente aos Substratos Bioquímicos

A identificação dos gêneros e espécies de bastonetes Gram-negativos é baseada na presença ou ausência de diferentes enzimas que participam do metabolismo bacteriano. Estas enzimas podem ser detectadas através da exposição bacteriana a diferentes meios de cultura contendo substratos, com os quais estas enzimas podem reagir. Quando as reações enzimáticas ocorrem, é possível detectar a utilização do substrato ou a presença de produtos metabólicos específicos, através da utilização de substâncias indicadoras.

A análise geral dos resultados dos testes bioquímicos mostra que, independente da classificação taxonômica das bactérias isoladas resistentes ao mercúrio, 88 % delas mostrou-se arabinose-positiva (n = 108); 82 % sacarose-positiva (n = 101); 80,5 % ramnose-positiva (n = 99) e 80,5 % sorbitol-positiva (n = 99). A utilização de vários carboidratos como fonte de carbono pode sugerir que estas bactérias apresentam uma versatilidade nutricional possivelmente relacionada a uma maior capacidade de adaptação a ambientes desfavoráveis, embora não sejam conhecidos estudos que associem o metabolismo de carboidratos ou outros substratos à presença do mecanismo de resistência ao mercúrio em bactérias.

Os resultados obtidos pelos testes bioquímicos aplicados aos isolados deste estudo foram comparados aos resultados esperados, adotando como padrão a tabela de classificação taxonômica fornecida pelo fabricante de cada sistema de identificação utilizado.

A partir desta comparação, foi possível observar que alguns representantes de gêneros e espécies bacterianas, como os isolados de *A. baumannii*, *Aeromonas* sp., *B. cepacia*, *P. putida*, *R. terrigena* e *Serratia* sp., não apresentaram resultados atípicos em relação ao padrão bioquímico esperado.

Por outro lado, algumas amostras apresentaram grandes diferenças em relação ao comportamento metabólico esperado frente a alguns substratos bioquímicos específicos. Os isolados bacterianos resistentes ao mercúrio que apresentaram maior número de variações metabólicas foram da espécie *E. coli*, oriundas de pontos localizados no Rio de Janeiro, com resultado negativo para o metabolismo da galactose (70 %) e da arginina (70 %), e resultado positivo para os testes de inositol (70 %), glicina (70 %) e ácido malônico (70 %), contrariando o comportamento padrão da maioria das amostras típicas pertencentes a esta espécie bacteriana.

**Tabela 6** – Variações Metabólicas Apresentadas pelos Isolados de *E. cloacae*.

| **Substratos Bioquímicos** | **Resultado Esperado** | **Percentual de Divergência dos Resultados Esperados** | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | **RJ (n = 13)** | **RO (n = 21)** | **MT (n = 4)** | **Total (n = 38)** |
| Inositol | Negativo | 15 % | 62 % | 75 % | 47 % |
| Lisina | Positivo | 44 % | 81 % | 0 | 63 % |
| Oxidase | Negativo | 8 % | 0 | 0 | 3 % |

Quanto às espécies que apresentaram maior número de isolamentos ao final de todas as coletas, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *Pantoea* sp., foram observadas variações expressivas quanto ao metabolismo de alguns substratos. A partir dos resultados apresentados na Tabela 6, observamos que apenas 37 % dos isolados de *E. cloacae* foram capazes de metabolizar o aminoácido lisina, quando o esperado, de acordo com a literatura [144], era que mais de 90 % dos isolados apresentassem resultado positivo neste teste. Este baixo índice deveu-se aos resultados apresentados por 19 % dos isolados de *E. cloacae* oriundos de Rondônia e 46 % dos isolados do Rio de Janeiro. Ao contrário, foi observado que quase metade (48 %) dos *E. cloacae*, isolados principalmente de áreas afetadas por efluentes domésticos e industriais no Rio de Janeiro e de pisciculturas em Mato Grosso, foi capaz de metabolizar o inositol através de fermentação, quando o comportamento padrão da espécie é descrito como a não utilização deste carboidrato como fonte de energia [144].

**Tabela 7** – Variações Metabólicas Apresentadas pelos Isolados de *K. pneumoniae*.

| Substratos Bioquímicos | Resultado Esperado | Percentual de Divergência dos Resultados Esperados | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | RJ (n = 8) | RO (n = 5) | RS (n = 9) | MT (n = 4) | Total (n = 26) |
| Sacarose | Positivo | 25 % | 0 | 0 | 0 | 8 % |
| Manitol | Positivo | 12 % | 0 | 11 % | 25 % | 11 % |
| Inositol | Positivo | 0 | 0 | 22 % | 0 | 8 % |
| p-n-p-B-galactosido | Positivo | 25 % | 0 | 22 % | 25 % | 19 % |
| Citrato | Positivo | 25 % | 0 | 0 | 0 | 8 % |
| Arginina | Positivo | 50 % | 20 % | 11 % | 0 | 35 % |
| Lisina | Positivo | 25 % | 0 | 0 | 0 | 8 % |
| Oxidase | Negativo | 0 | 20 % | 0 | 0 | 4 % |

A Tabela 7 mostra que, embora o esperado fosse que mais de 90 % dos isolados de *K. pneumoniae* apresentasse resultado positivo para o metabolismo da arginina [144], apenas 65 % destes isolados foram capazes de utilizar este aminoácido como fonte de energia. Este baixo índice deveu-se à divergência metabólica apresentada por 20 % dos isolados de áreas afetadas por efluentes de mineração no estado de Rondônia e 50 % dos isolados de áreas afetadas por efluentes domésticos e industriais no Rio de Janeiro.

Inversamente, era esperado que a maioria dos isolados de *Pantoea* sp. apresentasse resultado negativo para o teste de indol, mas a maior parte das amostras, isoladas de uma represa localizada em Rondônia, mostrou-se positiva quanto ao metabolismo do aminoácido triptofano, como descrito na Tabela 8.

**Tabela 8** – Variações Metabólicas Apresentadas pelos Isolados de *Pantoea* sp.

| Substratos Bioquímicos | Resultado Esperado | Percentual de Divergência dos Resultados Esperados | | |
|---|---|---|---|---|
| | | RO (n = 11) | MT (n = 1) | Total (n = 12) |
| Ramnose | Positivo | 9 % | 0 | 8 % |
| Manitol | Positivo | 9 % | 0 | 8 % |
| Indol | Negativo | 91 % | 0 | 83 % |

De acordo com Oliveira e Pampulha [145], a maioria dos microrganismos do trato intestinal humano, quando submetida às condições adversas que predominam nos corpos d'água, tende a decrescer em número, devido à competitividade e condições inadequadas para o seu crescimento. Porém, a reconhecida capacidade de adaptação bacteriana favorece a sobrevivência daquelas que melhor se integram às condições ambientais, através do desenvolvimento de novas funções metabólicas que permitiriam a utilização dos nutrientes disponíveis nos ecossistemas como fontes de energia pelas bactérias.

### 4.6. Relação entre os Níveis de Resistência ao Mercúrio apresentados pelas Bactérias de acordo com as Regiões Geográficas de Origem

Os resultados dos ensaios indicam que 96 % das amostras bacterianas isoladas dos ecossistemas aquáticos estudados apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, independente dos pontos de coleta apresentarem ou não um histórico de contaminação por mercúrio (Tabela 9). No Rio de Janeiro, isolados de *E. cloacae* (n = 13; 28 %), *K. pneumoniae* (n = 8; 17 %) e *E. coli* (n = 5; 11 %) apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM. Em Rondônia, todas as bactérias isoladas apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, com destaque para *E. cloacae* (n = 21; 40 %), *Pantoea* sp. (n = 11; 21 %) e *K. pneumoniae* (n = 5; 10 %). Do total de isolados em Mato Grosso apresentando $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, 25 % foram *E. cloacae* (n = 3), 25 % *K. pneumoniae* (n = 3), 17 % *A. baumannii* (n = 2) e 8 % *Pantoea* sp. (n = 1), com representantes da mesma espécie (*E. cloacae* e *K. pneumoniae*) apresentando valores de $CMI_{Hg}$ diferentes (Tabela 9). No Rio Grande do Sul, todas as bactérias isoladas (*K. pneumoniae*) apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM.

Foi observado que um pequeno número de isolados apresentou níveis de $CMI_{Hg}$ mais elevados (> 20 μM), aparentemente sem relação com gênero ou espécie bacterianos identificados, mas algumas espécies apresentaram maior nível de resistência

ao mercúrio em algumas regiões geográficas. Apenas um isolado da espécie *E. cloacae*, oriundo de coletas realizadas em pisciculturas localizadas em Mato Grosso, apresentou $CMI_{Hg}$ igual a 30 μM. Enquanto isso, os outros 38 isolados da mesma espécie, oriundos do Rio de Janeiro, Rondônia e Mato Grosso, apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, independente do histórico de contaminação por mercúrio nas regiões.

Da mesma forma, 1 isolado de *K. pneumoniae* oriundo de pisciculturas de Mato Grosso apresentou $CMI_{Hg}$ igual a 30 μM e os outros 26 isolados, provenientes de todas as regiões estudadas, apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM. Dois isolados bacterianos obtidos de pontos de coleta afetados pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais no Rio de Janeiro apresentaram $CMI_{Hg}$ superior a 20 μM, identificados como *R. terrigena* (25 μM) e *L. adecarboxylata* (30 μM).

Portanto, podemos observar que a maioria das bactérias isoladas de todas as regiões geográficas apresentou $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM. Apenas 2 isolados (*R. terrigena* e *L. adecarboxylata*) de áreas afetadas por efluentes domésticos e industriais na região sudeste e 2 isolados (*E. cloacae* e *K. pneu*moniae) de pisciculturas na região centro-oeste apresentaram $CMI_{Hg}$ superior a 20 μM.

**Tabela 9** – Concentração Mínima Inibitória de Mercúrio Apresentada pelas Bactérias Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos.

| Espécies Identificadas | Nº Isolados | $CMI_{Hg}$ | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 20 µM | 25 µM | 30 µM |
| **Rio de Janeiro (total)** | 43 | 41 (95 %) | 1 (2 %) | 1 (2 %) |
| *E. cloacae* | 13 | 13 (100 %) | 0 | 0 |
| *K. pneumoniae* | 8 | 8 (100 %) | 0 | 0 |
| *E. coli* | 5 | 5 (100 %) | 0 | 0 |
| *Aeromonas* sp. | 2 | 2 (100 %) | 0 | 0 |
| *V. metschnikovii* | 2 | 2 (100%) | 0 | 0 |
| *P. putida* | 2 | 2 (100 %) | 0 | 0 |
| *Enterobacter* sp. | 2 | 2 (100 %) | 0 | 0 |
| *E. aerogenes* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *E. asburiae* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *K. oxytoca* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *L. adecarboxylata* | 1 | 0 | 0 | 1 (100 %) |
| *R. terrigena* | 1 | 0 | 1 (100 %) | 0 |
| *Serratia* sp. | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *S. odorifera* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *S. paucimobilis* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *S. maltophila* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| **Rondônia (total)** | 50 | 50 (100 %) | 0 | 0 |
| *E. cloacae* | 21 | 21 (100 %) | 0 | 0 |
| *Pantoea* sp. | 11 | 11 (100 %) | 0 | 0 |
| *K. pneumoniae* | 5 | 5 (100 %) | 0 | 0 |
| *Serratia* sp. | 4 | 4 (100 %) | 0 | 0 |
| *Enterobacter* sp. | 2 | 2 (100 %) | 0 | 0 |
| *R. ornithinolytica* | 2 | 2 (100 %) | 0 | 0 |
| *A. baumannii* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *B. cepacia* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *Kluyvera* sp. | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *K. cryocrescens* | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| *Pseudomonas* sp. | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| **Mato Grosso (total)** | 11 | 9 (82 %) | 0 | 2 (18 %) |
| *E. cloacae* | 4 | 3 (75 %) | 0 | 1 (25 %) |
| *K. pneumoniae* | 4 | 3 (75 %) | 0 | 1 (25 %) |
| *A. baumannii* | 2 | 2 (100 %) | 0 | 0 |
| *Pantoea* sp. | 1 | 1 (100 %) | 0 | 0 |
| **Rio Grande do Sul (total)** | 9 | 9 (100 %) | 0 | 0 |
| *K. pneumoniae* | 9 | 9 (100%) | 0 | 0 |
| **Total** | **113** | **109 (96 %)** | **1 (1 %)** | **3 (3 %)** |

## 4.7. Associação entre as Resistências ao Mercúrio e a Antimicrobianos nas Bactérias

Foi observado que a maioria (80 %) dos isolados (n = 113), que apresentaram resistência ao mercúrio ($CMI_{Hg} \geq 20$ μM), foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano testado (Tabela 10). O antimicrobiano ao qual as bactérias Gram-negativas $Hg^R$, analisadas em conjunto, foram mais frequentemente resistentes foi a Ampicilina (AMP; 72 %), seguida por Tetraciclina (TE; 11,5 %), Ácido Nalidíxico (NAL; 10 %), Cloranfenicol (C; 8 %), Sulfametoxazol-Trimetoprim (SXT; 7 %), Canamicina (K; 4 %) e Gentamicina (Gm; 2 %). Por outro lado, todos os isolados foram sensíveis a Estreptomicina (S), um antimicrobiano nefrotóxico e ototóxico utilizado nos casos de resistência ou intolerância aos fármacos empregados no esquema principal preconizado para o tratamento da tuberculose [146].

De acordo com Tenover [78], as enterobactérias são frequentemente sensíveis aos antimicrobianos testados, porém os gêneros *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. e *Serratia* sp. podem apresentar resistência natural à Ampicilina, o que pode explicar o alto índice de resistência observado nesta amostragem a este fármaco. Dentre os antimicrobianos testados, o grupo dos aminoglicosídeos apresentou o maior potencial de inibição do crescimento bacteriano, menos que 5 % dos isolados foram resistentes a pelo menos uma destas drogas (Canamicina, Gentamicina e Estreptomicina).

Não foram observadas diferenças de resistência a antimicrobianos entre as diferentes regiões geográficas estudadas, assim como não foi possível associar os diferentes níveis de resistência ao Hg ($CMI_{Hg}$) a perfis específicos de resistência antimicrobiana.

**Tabela 10** – Resistência a Antimicrobianos Apresentada pelas Bactérias Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos.

| Gênero / Espécie Bacteriana | Resistência aos Antimicrobianos | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AMP | | TE | | NAL | | C | | SXT | | K | | Gm | | S | | MR | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| *E. cloacae* (n = 38) | 35 | 92 | 4 | 10,5 | 2 | 5 | 1 | 3 | 2 | 5 | 1 | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 2 | 5 |
| *K. pneumoniae* (n = 26) | 23 | 88,5 | 2 | 8 | 0 | 0 | 2 | 8 | 2 | 8 | 2 | 8 | 1 | 4 | 0 | 0 | 3 | 11,5 |
| *Pantoea* sp. (n = 12) | 2 | 17 | 0 | 0 | 1 | 8 | 1 | 8 | 0 | 0 | 1 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 8 |
| *E. coli* (n = 5) | 0 | 0 | 4 | 80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Serratia* sp. (n = 5) | 3 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Enterobacter* sp. (n = 4) | 3 | 75 | 1 | 25 | 0 | 0 | 1 | 25 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 25 |
| *A. baumannii* (n = 3) | 3 | 100 | 1 | 33 | 1 | 33 | 3 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 33 |
| *V. metschnikovii* (n = 2) | 1 | 50 | 0 | 0 | 1 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *R. ornithinolytica* (n = 2) | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Aeromonas* sp. (n = 2) | 2 | 100 | 0 | 0 | 2 | 100 | 0 | 0 | 1 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 50 |
| *P. putida* (n = 2) | 2 | 100 | 0 | 0 | 2 | 100 | 1 | 50 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 100 |
| *K. oxytoca* (n = 1) | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *E. aerogenes* (n = 1) | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *E. asburiae* (n = 1) | 1 | 100 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S. odorifera* (n = 1) | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *R. terrigena* (n = 1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *L. adecarboxylata* (n = 1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S. maltophila* (n = 1) | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *S. paucimobilis* (n = 1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *B. cepacia* (n = 1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Pseudomonas* sp. (n = 1) | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *K. cryocrescens* (n = 1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Kluyvera* sp. (n = 1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Total** (n = 113 ) | **81** | **72** | **13** | **11,5** | **11** | **10** | **9** | **8** | **8** | **7** | **5** | **4** | **2** | **2** | **0** | **0** | **11** | **10** |

Observou-se também a ocorrência de multi-resistência (MR) a antimicrobianos diferentes combinados (de 2 até 5 antimicrobianos), onde os associados com maior frequência foram a Ampicilina, o Ácido Nalidíxico, o Cloranfenicol, a Tetraciclina e o Sulfametoxazol-Trimetoprim, todos representantes de classes diferentes de antimicrobianos. Ao todo, foram observados 18 perfis de resistência a antimicrobianos nos isolados testados, descritos no Quadro 1.

**Quadro 1** – Perfis de Resistência a Antimicrobianos Observados nos Isolados Bacterianos Resistentes ao Mercúrio.

| Perfil | Antimicrobianos relacionados ao Perfil de Resistência |
|---|---|
| I | NAL |
| II | AMP |
| III | AMP + NAL |
| IV | AMP + K |
| V | AMP + C |
| VI | AMP + SXT |
| VII | AMP + TE |
| VIII | AMP + NAL + SXT |
| IX | AMP + C + K |
| X | AMP + C + TE |
| XI | AMP + C + NAL + K |
| XII | AMP + C + NAL + SXT |
| XIII | AMP + C + TE + NAL |
| XIV | AMP + C + TE + Gm + SXT |
| XV | AMP + Gm + K |
| XVI | AMP + TE + SXT |
| XVII | AMP + TE + SXT + NAL |
| XVIII | TE |
| S | Sensível a todos os antimicrobianos testados |

A associação observada entre as resistências ao mercúrio e a antimicrobianos corrobora outros estudos, sendo comumente descrita na literatura [35,87,141,147,148,149]. Este resultado pode ser consequência da emissão crescente de antibióticos no ambiente devido ao seu uso indiscriminado na medicina e na agricultura. A poluição dos rios, uma das principais fontes de água para consumo humano e animal, pode desempenhar um importante papel contribuindo para a seleção e a disseminação das bactérias resistentes aos antibióticos, caracterizando um grave problema de Saúde Pública [143].

Os isolados bacterianos oriundos do Rio de Janeiro que apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM apresentaram 10 perfis diferentes de resistência a antimicrobianos e alguns isolados foram resistentes a mais de um antimicrobiano, conjugando Ampicilina, Ácido Nalidíxico, Canamicina, Cloranfenicol, Tetraciclina e Sulfametoxazol-Trimetoprim simultaneamente. Por outro lado, os isolados desta região que apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 25 μM ou 30 μM tiveram seu crescimento inibido por todos os antimicrobianos testados, como pode ser observado na Tabela 11.

Os isolados oriundos de Rondônia, onde todos apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, mostraram 5 perfis de resistência a antimicrobianos. Algumas amostras foram resistentes simultaneamente a Ácido Nalidíxico, Ampicilina, Cloranfenicol, Canamicina e Sulfametoxazol-Trimetoprim.

As amostras bacterianas coletadas em Mato Grosso que apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM mostraram 9 perfis de resistência diferentes. Algumas amostras foram resistentes a Ácido Nalidíxico, Ampicilina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Canamicina, Gentamicina e Sulfametoxazol-Trimetoprim, associando de 2 a 5 destes antimicrobianos simultaneamente. Por outro lado, as amostras coletadas nesta região que apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 30 μM foram resistentes a 2 perfis diferentes de resistência, conjugando Ampicilina, Tetraciclina e Sulfametoxazol-Trimetoprim simultaneamente.

Os isolados bacterianos coletados no Rio Grande do Sul, os quais apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, mostraram 3 perfis diferentes de resistência, associando Ampicilina, Sulfametoxazol-Trimetoprim, Cloranfenicol e Canamicina.

O perfil de resistência à Ampicilina (perfil II) foi observado no maior número de espécies diferentes na amostragem: *Enterobacter* sp., *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Pantoea* sp., *R. ornithinolytica*, *Serratia* sp., *S. maltophila* e *V. metschnikovii* (Tabela 12).

**Tabela 11** – Perfis de Resistência a Antimicrobianos Detectados nas Bactérias Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos.

| $CMI_{Hg}$ | Região Geográfica | Perfil de Resistência | Nº de Isolados |
|---|---|---|---|
| 20 μM | Norte (RO) | NAL | 1 |
| | | AMP | 31 |
| | | AMP + K | 1 |
| | | AMP + C | 1 |
| | | AMP + SXT | 1 |
| | | Sensível | 15 |
| 20 μM | Sudeste (RJ) | NAL | 2 |
| | | AMP | 19 |
| | | AMP + NAL | 2 |
| | | AMP + K | 1 |
| | | AMP + C | 1 |
| | | AMP + NAL + SXT | 2 |
| | | AMP + C + TE | 1 |
| | | AMP + C + NAL + SXT | 1 |
| | | TE | 6 |
| | | Sensível | 6 |
| 20 μM | Centro-Oeste (MT) | AMP | 2 |
| | | AMP + C | 1 |
| | | AMP + TE | 1 |
| | | AMP + C + NAL + K | 1 |
| | | AMP + C + TE + NAL | 1 |
| | | AMP + C + TE + Gm + SXT | 1 |
| | | AMP + Gm + K | 1 |
| | | AMP + TE + SXT + NAL | 1 |
| 20 μM | Sul (RS) | AMP | 7 |
| | | AMP + SXT | 1 |
| | | AMP + C + K | 1 |
| 25 μM | Sudeste (RJ) | Sensível | 1 |
| 30 μM | Sudeste (RJ) | Sensível | 1 |
| 30 μM | Centro-Oeste (MT) | AMP + TE | 1 |
| | | AMP + TE + SXT | 1 |

A ocorrência da maioria dos perfis de resistência a antimicrobianos foi observada em poucas espécies bacterianas. Cinco perfis de resistência ocorreram apenas em isolados coletados no Rio de Janeiro e que apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM: perfil III / AMP + NAL (*Aeromonas* sp. e *E. asburiae*), perfil VIII / AMP + NAL + SXT (*Aeromonas* sp. e *P. putida*), perfil X / AMP + C + TE (*Enterobacter* sp.), perfil XII /

AMP + C + NAL + SXT (*P. putida*) e perfil XVIII / TE (*E. coli*, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*). Outros 5 perfis de resistência foram observados somente em isolados coletados em Mato Grosso e que apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM: perfil XI / AMP + C + NAL + K (*Pantoea* sp.), perfil XIII / AMP + C + TE + NAL (*A. baumannii*), perfil XIV / AMP + C + TE + Gm + SXT (*E. cloacae*), perfil XV / AMP + Gm + K (*K. pneumoniae*) e perfil XVII / AMP + TE + SXT + NAL (*E. cloacae*). O perfil IX / AMP + C + K foi observado somente nas *K. pneumoniae* isoladas no Rio Grande do Sul.

Obteve-se um elevado número de perfis de resistência com um reduzido número de espécies integrantes. Por exemplo, o perfil I (NAL) é observado apenas em três isolados, *B. cepacia* (n = 1), *E. cloacae* (n = 1) e *V. metschnikovii* (n = 1), oriundos do Rio de Janeiro e Rondônia, com $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM. O mesmo ocorre com o perfil IV (AMP + K), presente em *E. cloacae* (n = 1) e *S. odorífera* (n = 1), com $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM e isoladas no Rio de Janeiro e Rondônia.

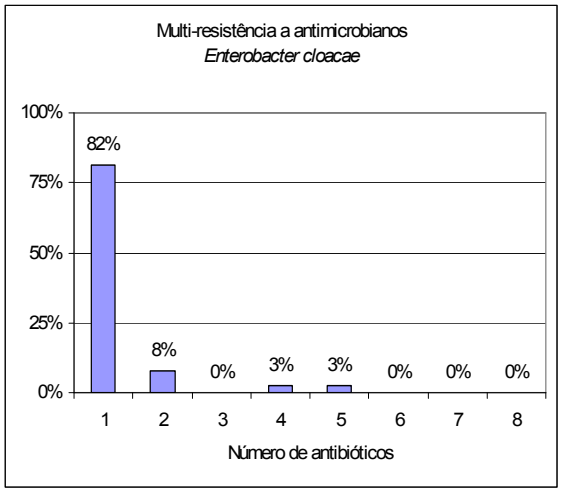
A mesma relação pode ser observada no perfil V (AMP + C), encontrado nos isolados de *A. baumannii* (n = 2) e *K. pneumoniae* (n = 1), coletados no Rio de Janeiro, Rondônia e Mato Grosso, com $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM. Da mesma forma, o perfil VI (AMP + SXT) também ocorre somente nas amostras de *Pseudomonas* sp. (n = 1) e *K. pneumoniae* (n = 1), isoladas em Rondônia e Rio Grande do Sul, com $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM.

Especificamente nos isolados pertencentes às espécies bacterianas mais prevalentes neste estudo podem-se observar variações nos perfis de resistência aos antimicrobianos dependendo da área geográfica de origem. No caso dos isolados dos sistemas aquáticos identificados como *E. cloacae* (n = 38), das 13 amostras isoladas no Rio de Janeiro, todas apresentando $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, 11 apresentaram o perfil II (AMP), 1 o perfil I (NAL) e 1 foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Dos 21 isolados da mesma espécie oriundos de Rondônia, todos apresentando $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, 19 apresentaram o perfil II (AMP), 1 o perfil IV (AMP + K) e 1 foi sensível a todos os antimicrobianos. Do total de 4 isolados de Mato Grosso, 3 apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM e os seguintes perfis de resistência: VII (AMP + TE; n = 1), XIV (AMP + C + TE + Gm + SXT; n = 1) e XVII (AMP + TE + SXT + NAL; n = 1); enquanto o isolado que apresentou $CMI_{Hg}$ igual a 30 μM também apresentou o perfil VII (AMP + TE; n = 1). O percentual de multi-resistência (de 2 a 5 antimicrobianos) apresentado pelas *E. cloacae* isoladas dos ecossistemas aquáticos brasileiros pode ser observado no Gráfico 2.

**Tabela 12** – Perfis de Resistência a Antimicrobianos Detectados nas Espécies Bacterianas Isoladas dos Diferentes Ecossistemas Aquáticos.

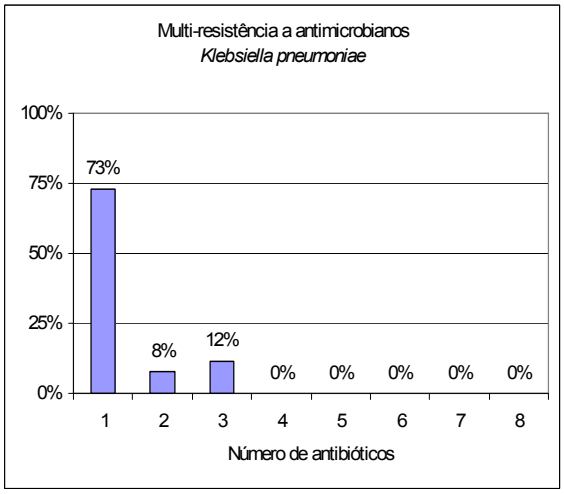
| $CMI_{Hg}$ | Região Geográfica | Perfil de Resistência | Espécies Bacterianas (nº de isolados) |
|---|---|---|---|
| 20 μM | Norte (RO) | I | *B. cepacia* (1) |
| | | II | *E. cloacae* (19), *K. pneumoniae* (5), *Enterobacter* sp. (2), *R. ornithinolytica* (2), *Serratia* sp. (2), *Pantoea* sp. (1) |
| | | IV | *E. cloacae* (1) |
| | | V | *A. baumannii* (1) |
| | | VI | *Pseudomonas* sp. (1) |
| | | S | *Pantoea* sp. (10), *Serratia* sp. (2), *E. cloacae* (1), *Kluyvera* sp. (1), *K. cryocrescens* (1) |
| 20 μM | Sudeste (RJ) | I | *E. cloacae* (1), *V. metschnikovii* (1) |
| | | II | *E. cloacae* (11), *K. pneumoniae* (4), *E. aerogenes* (1), *Serratia* sp. (1), *S. maltophila* (1), *V. metschnikovii* (1) |
| | | III | *Aeromonas* sp. (1), *E. asburiae* (1) |
| | | IV | *S. odorifera* (1) |
| | | V | *K. pneumoniae* (1) |
| | | VIII | *Aeromonas* sp. (1), *P. putida* (1) |
| | | X | *Enterobacter* sp. (1) |
| | | XII | *P. putida* (1) |
| | | XVIII | *E. coli* (4), *K. pneumoniae* (1), *K. oxytoca* (1) |
| | | S | *K. pneumoniae* (2), *Enterobacter* sp. (1), *E. cloacae* (1), *E. coli* (1), *S. paucimobilis* (1) |
| 20 μM | Centro-Oeste (MT) | II | *K. pneumoniae* (2) |
| | | V | *A. baumannii* (1) |
| | | VII | *E. cloacae* (1) |
| | | XI | *Pantoea* sp. (1) |
| | | XIII | *A. baumannii* (1) |
| | | XIV | *E. cloacae* (1) |
| | | XV | *K. pneumoniae* (1) |
| | | XVII | *E. cloacae* (1) |
| 20 μM | Sul (RS) | II | *K. pneumoniae* (7) |
| | | VI | *K. pneumoniae* (1) |
| | | IX | *K. pneumoniae* (1) |
| 25 μM | Sudeste (RJ) | S | *R. terrigena* (1) |
| 30 μM | Sudeste (RJ) | S | *L. adecarboxylata* (1) |
| 30 μM | Centro-Oeste (MT) | VII | *E. cloacae* (1) |
| | | XVI | *K. pneumoniae* (1) |

**Gráfico 2** – Percentual de *E. cloacae* Multi-Resistentes a Antimicrobianos.



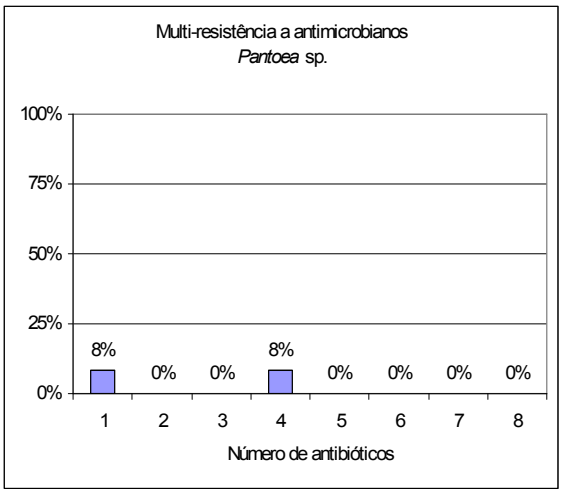

Quanto às amostras bacterianas identificadas como *K. pneumoniae* (n = 26), das 8 isoladas no Rio de Janeiro, todas apresentando $CMI_{Hg}$ igual a 20 µM, 4 foram resistentes a AMP (perfil II), 1 ao perfil AMP + C (perfil V), 1 ao perfil XVIII (TE) e 2 sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Todas as 5 amostras desta espécie isoladas em Rondônia apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 µM e resistência à ampicilina (perfil II). Do total de *K. pneumoniae* isoladas em Mato Grosso (n = 4), 3 apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 µM, destas, 2 apresentaram o perfil II (AMP) e 1 o perfil XV (AMP + Gm + K), enquanto 1 isolado apresentou $CMI_{Hg}$ igual a 30 µM e perfil XVI (AMP + TE + SXT). Das 9 amostras de *K. pneumoniae* isoladas no Rio Grande do Sul, onde todas apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 µM, 7 tiveram o perfil II (AMP), 1 o perfil IX (AMP + C + K) e 1 o perfil VI (AMP + SXT). O percentual de multi-resistência apresentado pelos isolados desta espécie pode ser observado no Gráfico 3.

**Gráfico 3** – Percentual de *K. pneumoniae* Multi-Resistentes a Antimicrobianos.



As 12 amostras de *Pantoea* sp. isoladas em Rondônia e Mato Grosso apresentaram $CMI_{Hg}$ igual a 20 μM, porém apenas o isolado de Mato Grosso apresentou o perfil de multi-resistência AMP + C + NAL + K (Gráfico 4), enquanto a maioria dos isolados de Rondônia foi sensível a todos os antimicrobianos testados (n = 10) e apenas um isolado daquela região foi resistente à Ampicilina.

**Gráfico 4** – Percentual de *Pantoea* sp. Multi-Resistentes a Antimicrobianos.




Os resultados observados nos isolados de *L. adecarboxylata* e *R. terrigena*, ambos resistentes a altos níveis de mercúrio (> 20 μM) e sensíveis aos antimicrobianos testados, podem ser relacionados a características destas espécies. As amostras de *Leclercia* sp. são descritas como bactérias naturalmente sensíveis a maioria dos antimicrobianos utilizados na rotina médica [150] e, de acordo com o estudo realizado por Corti *et al*. [151], mesmo amostras deste gênero envolvidas em infecções clínicas mostraram-se sensíveis a Aminoglicosídeos, Tetraciclinas, Penicilinas, Ácido Nalidíxico e Cloranfenicol. Quanto aos isolados de *R. terrigena*, espécie anteriormente pertencente ao gênero *Klebsiella*, além de apresentarem resistência conhecida somente a Penicilinas [152,153], apresentam uma espessa cápsula polissacarídica que reduz sua permeabilidade celular aos antibióticos [154].

A existência de uma forte associação entre as resistências a poluentes ambientais e a antibióticos em amostras de bactérias Gram-negativas está amplamente descrita na literatura [35,80,81,82] como variável entre 50 % e 80 %. Assim, esperávamos observar uma elevada incidência de resistência e talvez multi-resistência a antibióticos nos isolados deste estudo, o que poderia inviabilizar o seu uso para a mitigação da poluição por mercúrio, uma vez que para a manipulação de bactérias multi-resistentes se faz

necessário a adoção de medidas especiais para a sua contenção no interior de reatores, a fim de garantir a biossegurança no processo de biorremediação.

Alguns estudos [84,155,156] relatam o isolamento de populações bacterianas resistentes a antibióticos em ambientes impactados pela liberação de substâncias químicas nocivas e resíduos de produtos biológicos, a partir de residências, hospitais e indústrias. Além disso, os genes que codificam a resistência múltipla a antimicrobianos e ao mercúrio têm sido identificados em uma ampla gama de hospedeiros, presentes em plasmídios conjugativos [123].

A aquisição de plasmídios pelas comunidades bacterianas ambientais pode desempenhar um papel importante na adaptação microbiana em ambientes impactados por atividades antropogênicas. Genes carreados por estes plasmídios podem conferir resistência a antibióticos e outros compostos tóxicos presentes no ambiente, resultando em um mosaico de elementos genéticos móveis e a seleção de subpopulaçôes bacterianas multi-resistentes em resposta à pressão seletiva exercida pelos poluentes. Por isso, quando plasmídios de resistência são introduzidos em comunidades microbianas ambientais, existe a possibilidade de bactérias patogênicas presentes adquirirem estes genes de resistência, resultando em patógenos humanos e animais resistentes à antibioticoterapia e representando um risco elevado para a saúde da população.

Em muitos casos, a ocorrência da resistência múltipla é mediada por plasmídios, tornando a bactéria resistente a dois ou mais antibióticos simultaneamente. Isso pode ser explicado pela localização comum de genes de resistência para diferentes antibióticos no mesmo plasmídio ou pela presença de mais de um plasmídio na célula bacteriana, que podem ser transferidos entre bactérias de grupos taxonômicos diferentes e disseminar suas características de resistência a antibióticos e metais tóxicos promovendo uma seleção de amostras resistentes em diferentes ecossistemas. Por exemplo, a principal forma de resistência das bactérias Gram-negativas aos Aminoglicosídeos, às Tetraciclinas, ao Cloranfenicol e ao Sulfametoxazol-Trimetoprim é mediada por plasmídios, com exceção da resistência ao Ácido Nalidíxico, determinada por mutação [34].

### 4.8. Presença do Gene *merA* nas Bactérias Resistentes ao Mercúrio

Inicialmente, foram selecionados três pares de iniciadores [56,74,110] descritos na literatura como adequados para a identificação do gene *merA* em amostras bacterianas resistentes ao mercúrio. Porém, no decorrer dos ensaios, não foi possível reproduzir os resultados obtidos por Felske *et al*. [74] e Sotero-Martins *et al*. [110], mesmo utilizando condições experimentais semelhantes às descritas pelos autores. Por outro lado, os iniciadores A1 e A5, descritos por Liebert *et al*. [56], revelaram a presença do fragmento de DNA correspondente a uma região conservada do gene *merA* nas cepas-padrão testadas (*Escherichia coli* ATCC 35218 $Hg^R$ e *Escherichia coli* ATCC 23724 $Hg^S$) e por isso foram adotados para identificar o gene *merA* nas bactérias Gram-negativas resistentes ao mercúrio isoladas neste estudo.

A presença do gene *merA* foi pesquisada em 113 amostras bacterianas Gram-negativas resistentes ao mercúrio, através da utilização de dois protocolos de amplificação. Um dos protocolos utilizou a enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen®, Estados Unidos) e o outro a enzima Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen®, Estados Unidos). Os resultados da técnica de amplificação após a utilização dos dois protocolos foram analisados comparativamente, a fim de facilitar a interpretação dos resultados gerados para cada amostra bacteriana.

Do total de amostras bacterianas testadas (n = 113), 73 % (n = 83) apresentaram resultado positivo na PCR utilizando os dois protocolos, 18 % (n = 20) apresentaram resultado negativo na PCR para um dos protocolos e 9 % (n = 10) apresentaram resultado negativo para os dois protocolos testados. A ausência de fragmentos amplificados detectáveis visualmente após a PCR foi considerada como resultado negativo. Adotou-se como resultado positivo a presença de produtos de amplificação detectáveis visualmente, independente do protocolo utilizado.

Na maioria das amostras bacterianas que apresentaram resultado positivo foram observados padrões polimórficos que definiram 39 perfis de amplificação (Quadro 2). Todos os perfis de amplificação, nomeados A, B, C e D (Figura 4), foram observados após a utilização da enzima polimerase Platinum® (Figura 5), enquanto apenas 6 destes perfis (3 perfis A e 3 perfis B) foram resultantes do protocolo que utilizou a enzima polimerase recombinante (Figura 6).

A maioria dos perfis (n = 21), denominados A (n = 3) e C (n = 18), apresentou o fragmento de DNA com o tamanho descrito por Liebert *et al*. [56] de 1234 pb, enquanto em 18 perfis, B (n = 3) e D (n = 15), não foi observada a amplificação deste fragmento.

Dos 6 perfis comuns resultantes da utilização dos dois protocolos de amplificação (3 perfis A e 3 perfis B), a metade apresentou o fragmento esperado (perfil A), enquanto a outra metade apresentou apenas fragmentos de DNA de outros tamanhos (perfil B). Dos 3 perfis que apresentaram o fragmento esperado, apenas um (perfil A1) não apresentou fragmentos de outros tamanhos conjugados ao de 1234 pb, enquanto nos outros dois perfis (A2 e A3) foi observada a amplificação de fragmentos de outros tamanhos.

**Quadro 2** – Perfis de Amplificação Observados nas Bactérias Resistentes ao Mercúrio Submetidas aos Dois Protocolos de PCR.

| **Perfil** | **Resultado da Amplificação [nº de fragmentos de DNA X (tamanho estimado, em pares de bases)]** | **Enzima Polimerase Utilizada** |
|---|---|---|
| A1 | 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Recombinante e Platinum® |
| A2 | 1 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Recombinante e Platinum® |
| A3 | 3 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Recombinante e Platinum® |
| B1 | 1 X (500 a 1000 pb) | Recombinante e Platinum® |
| B2 | 2 X (500 a 1000 pb) | Recombinante e Platinum® |
| B3 | 3 X (500 a 1000 pb) | Recombinante e Platinum® |
| C1 | 1 X (< 500 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C2 | 1 X (< 500 pb) + 2 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C3 | 1 X (< 500 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) + 1 X (2000 a 2500 pb) | Platinum® |
| C4 | 1 X (< 500 pb) + 1 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C5 | 1 X (< 500 pb) + 1 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) + 1 X (2000 a 2500 pb) | Platinum® |
| C6 | 1 X (< 500 pb) + 2 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) + 1 X (2000 a 2500 pb) | Platinum® |
| C7 | 1 X (< 500 pb) + 1 X (500 a 1000 pb) + 2 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C8 | 1 X (< 500 pb) + 2 X (500 a 1000 pb) + 2 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C9 | 1 X (< 500 pb) + 3 X (500 a 1000 pb) + 2 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C10 | 2 X (< 500 pb) + 2 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C11 | 2 X (< 500 pb) + 3 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) + 1 X (1500 a 2000 pb) | Platinum® |
| C12 | 3 X (< 500 pb) + 4 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C13 | 3 X (< 500 pb) + 4 X (500 a 1000 pb) + 2 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C14 | 3 X (< 500 pb) + 4 X (500 a 1000 pb) + 3 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C15 | 2 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |

**Quadro 2** – Perfis de Amplificação Observados nas Bactérias Resistentes ao Mercúrio Submetidas aos Dois Protocolos de PCR.

(continuação)

| Perfil | Resultado da Amplificação [nº de fragmentos de DNA X (tamanho estimado, em pares de bases)] | Enzima Polimerase Utilizada |
|---|---|---|
| C16 | 2 X (500 a 1000 pb) + 2 X (**1000 a 1500 pb**) + 1 X (2000 a 2500 pb) | Platinum® |
| C17 | 5 X (500 a 1000 pb) + 1 X (**1000 a 1500 pb**) | Platinum® |
| C18 | 1 X (**1000 a 1500 pb**) + 1 X (1500 a 2000 pb) | Platinum® |
| D1 | 1 X (< 500 pb) | Platinum® |
| D2 | 1 X (< 500 pb) + 1 X (500 a 1000 pb) | Platinum® |
| D3 | 1 X (< 500 pb) + 2 X (500 a 1000 pb) | Platinum® |
| D4 | 1 X (< 500 pb) + 2 X (500 a 1000 pb) + 1 X (1500 a 2000 pb) | Platinum® |
| D5 | 1 X (< 500 pb) + 3 X (500 a 1000 pb) + 1 X (1500 a 2000 pb) | Platinum® |
| D6 | 1 X (< 500 pb) + 4 X (500 a 1000 pb) + 1 X (1500 a 2000 pb) | Platinum® |
| D7 | 1 X (< 500 pb) + 1 X (500 a 1000 pb) + 1 X (2500 a 3000 pb) | Platinum® |
| D8 | 2 X (< 500 pb) + 1 X (500 a 1000 pb) | Platinum® |
| D9 | 2 X (< 500 pb) + 2 X (500 a 1000 pb) | Platinum® |
| D10 | 3 X (< 500 pb) + 2 X (500 a 1000 pb) | Platinum® |
| D11 | 3 X (< 500 pb) + 5 X (500 a 1000 pb) | Platinum® |
| D12 | 1 X (500 a 1000 pb) + 1 X (1500 a 2000 pb) | Platinum® |
| D13 | 1 X (500 a 1000 pb) + 1 X (2000 a 2500 pb) | Platinum® |
| D14 | 2 X (500 a 1000 pb) + 1 X (1500 a 2000 pb) | Platinum® |
| D15 | 6 X (500 a 1000 pb) + 1 X (2000 a 2500 pb) | Platinum® |

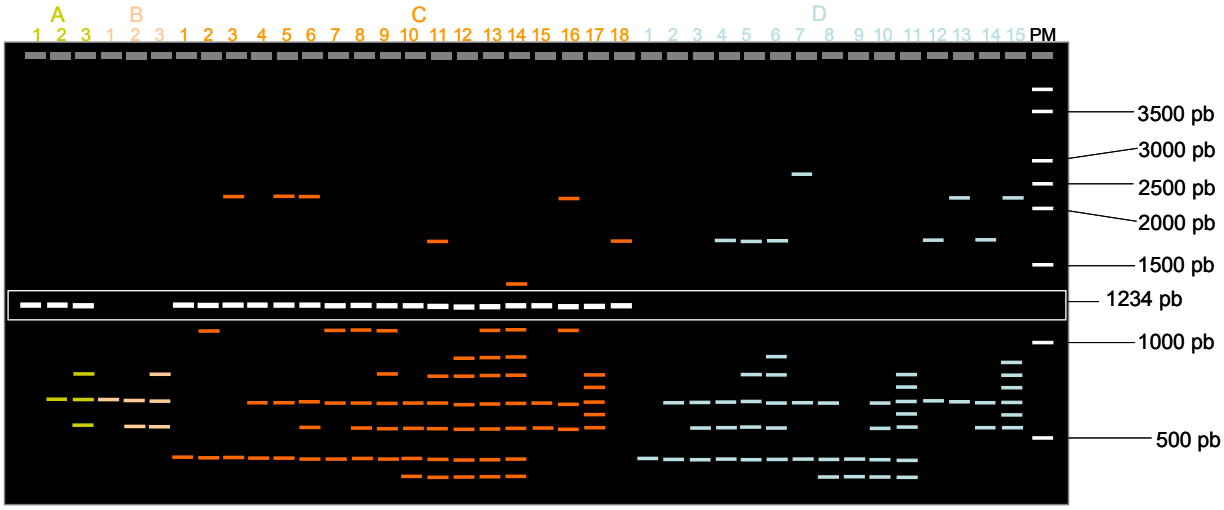



**Figura 4** – Representação Gráfica dos Perfis de Amplificação Observados nas Bactérias Isoladas a partir da Amplificação do Gene *merA* Utilizando as Enzimas Platinum® Taq DNA Polimerase (perfis A, B, C e D) e Taq DNA Polimerase Recombinante (perfis A e B). PM = DNA Ladder 1 Kb (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

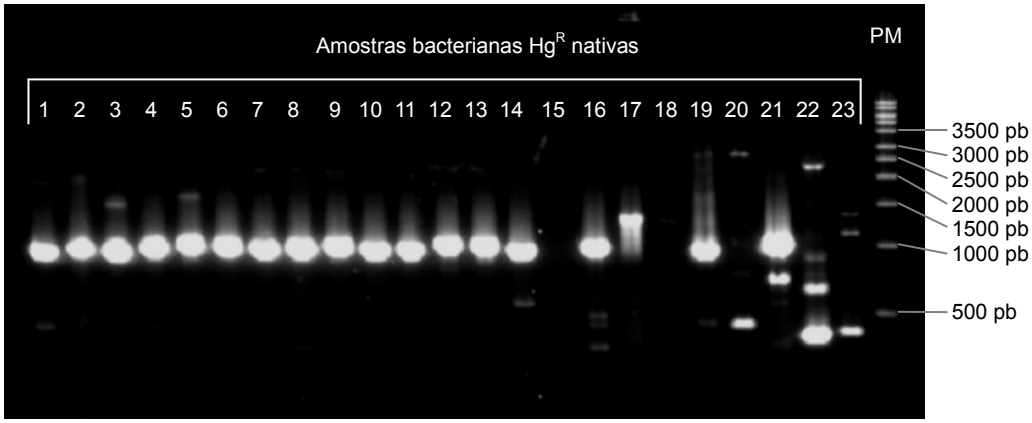



**Figura 5** – Visualização de Fragmentos de Tamanhos Variados a partir da Amplificação do Gene *merA* Utilizando a Enzima Platinum® Taq DNA Polimerase. Estas amostras apresentaram os perfis A (canaletas 1, 2, 4, 6-14, 17, 21), C (canaletas 3, 5, 16, 22, 23), D (canaletas 19, 20) e negativo (canaletas 15, 18). PM = DNA Ladder 1 Kb (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

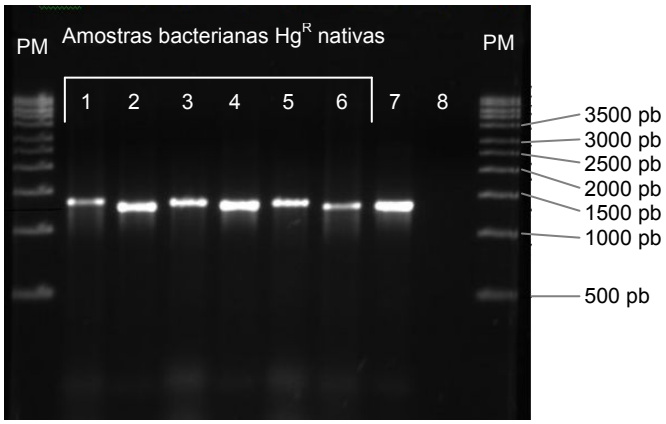



**Figura 6** – Visualização do Fragmento de 1234 pb a partir da Amplificação do Gene *merA* Utilizando a Enzima Taq DNA Polimerase Recombinante. Estas amostras apresentaram o perfil A1 (canaletas 1-6). Amostras-controle: (7) *E. coli* ATCC 35218, positivo e (8) *E. coli* ATCC 23724, negativo. PM = DNA Ladder 1 Kb (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

Analisando os produtos de amplificação obtidos utilizando a enzima polimerase recombinante, observou-se a ocorrência de 6 perfis de amplificação (A1-A3 e B1-B3) nos 113 isolados bacterianos analisados.

Com a utilização deste protocolo, a maioria dos isolados (n = 84; 74 %) apresentou resultado positivo para a pesquisa do gene *merA*, enquanto que em 26 % (n = 29) dos isolados o resultado foi negativo (Tabela 13). As amostras isoladas que apresentaram fragmentos de DNA amplificados foram classificadas nos perfis A (n = 61; 54 %) e B (n = 23; 20 %) e distribuíram-se principalmente pelos perfis A1 (n = 41; 36 %), A2 (n = 19; 17 %), B1 (n = 12; 11 %) e B2 (n = 10; 9 %). Os perfis A3 (1 %) e B3 (1 %) foram exibidos individualmente por apenas uma amostra.

Esses resultados foram caracterizados pela presença de fragmentos com 1234 pb na maioria dos isolados analisados (54 %), sendo que em alguns casos (20 %) obteve-se não só a amplificação do fragmento esperado, mas também de outros fragmentos de DNA com tamanhos variando de 500 pb a 1000 pb.

**Tabela 13** – Relação entre o Número de Bactérias Resistentes ao Mercúrio e os Perfis de Amplificação Observados.

| Enzimas Polimerase | Perfis de Amplificação | | | | | | | | Positivo | | Negativo | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A (A1-A3) | | B (B1-B3) | | C (C1-C18) | | D (D1-D15) | | | | | |
| | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Recombinante | 61 | 54 | 23 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 84 | 74 | 29 | 26 |
| Platinum® | 15 | 13 | 22 | 19 | 32 | 29 | 33 | 29 | 102 | 90 | 11 | 10 |

Por outro lado, algumas amostras (26 %) não apresentaram o fragmento esperado. A ausência deste fragmento nas amostras pode indicar que elas possuem outro mecanismo de resistência ao mercúrio, ou ainda que possuam um gene *merA* que apresenta uma variação importante na sequência de nucleotídeos, na região utilizada para o desenho dos iniciadores.

Com a utilização da enzima Platinum® Taq DNA Polimerase, os produtos de amplificação obtidos apontam a ocorrência de 39 perfis de amplificação (A1-A3, B1-B3, C1-C18 e D1-D15) nos 113 isolados bacterianos analisados.

Com este protocolo, a maioria dos isolados (n = 102; 90 %) apresentou resultado positivo para a pesquisa do gene *merA*. De acordo com as combinações de fragmentos de DNA amplificados, os resultados foram classificados nos perfis D (n = 33; 29 %), C (n = 32; 29 %), B (n = 22; 19 %) e A (n = 15; 13 %).

Os perfis B1 (n = 16; 14 %), D2 (n = 12; 11 %), C15 (n = 9; 8 %), A2 (n = 7; 6 %) e A1 (n = 5; 4 %) foram observados com maior freqüência nas amostras e 21 perfis (19 %) foram apresentados por apenas uma amostra (1 %). É importante destacar que somente 10 % das amostras (n = 11) não apresentaram qualquer fragmento amplificado, sugerindo a ocorrência de alterações importantes na sequência do gene *merA* nestas amostras ou a utilização de outro mecanismo de resistência ao mercúrio.

Estes resultados revelam que, com a utilização da enzima Platinum®, 42 % das amostras (n = 47) apresentou fragmentos com 1234 pb (perfis A e C). Porém, a maioria das amostras analisadas (49 %) foi caracterizada pela amplificação de outros fragmentos de DNA com tamanhos variando de 500 pb a 3000 pb.

## 4.9. Análise Comparativa dos Resultados gerados pelas Enzimas Taq DNA Polimerase Recombinante e Platinum®

Analisando os resultados das reações de PCR realizadas com os dois protocolos, podemos observar que a enzima recombinante foi capaz de amplificar fragmentos de DNA em 84 das 113 amostras bacterianas analisadas, o equivalente a 74 % da amostragem. A maioria destas 84 amostras positivas (n = 61; 73 %) apresentou o fragmento descrito por Liebert *et al*. [56], enquanto as outras 23 amostras (27 %) apresentaram fragmentos amplificados de outros tamanhos, não correspondentes ao intervalo entre 1000 pb e 1500 pb onde o fragmento esperado (1234 pb) está localizado.

Por outro lado, quando avaliamos os resultados gerados pela ação da enzima Platinum®, observamos que das 113 amostras testadas, 102 (90 %) foram positivas para a pesquisa do gene *merA*. No entanto, ao contrário do resultado obtido com a utilização da enzima recombinante, a maior parte destas amostras (n = 55; 49 %) não amplificou o fragmento esperado, pois o percentual de amostras que apresentaram o fragmento de 1234 pb foi igual a 42 %. Também é importante destacar que somente 10 % das amostras apresentaram resultado negativo quando esta enzima foi utilizada.

Comparando os resultados exibidos pelos dois protocolos, podemos observar que das 113 amostras bacterianas testadas, 83 (73 %) destas apresentaram resultado positivo para a pesquisa do gene *merA*, ou seja, houve amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos variados, além da presença do fragmento esperado (1234 pb). Se considerarmos apenas a presença do fragmento de 1234 pb, 25 amostras (22 %) foram positivas tanto na reação utilizando a enzima recombinante quanto com a enzima Platinum®.

Algumas amostras apresentaram resultado positivo na amplificação de fragmentos de DNA apenas quando a enzima Platinum® foi utilizada (n = 20; 18 %), enquanto em apenas 1 amostra (1 %) houve a detecção de fragmentos somente com a enzima recombinante, sem que a enzima Platinum® tivesse sido capaz de identificá-los. O contrário aconteceu com a sensibilidade na detecção dos fragmentos de 1234 pb, cujo percentual de positividade apresentado com a utilização da enzima recombinante foi igual a 31 % (n = 35), enquanto com a aplicação da enzima Platinum® a presença destes fragmentos foi revelada em menor número de amostras bacterianas (n = 22; 19,5 %).

Embora tenha sido grande o número de perfis de amplificação gerados com a utilização da enzima Platinum®, apenas 6 perfis foram apresentados também com o uso

da enzima recombinante. Destes perfis de amplificação compartilhados pelas duas metodologias, o perfil A1 foi o único gerado pelas duas enzimas com resultados coincidentes em algumas amostras (n = 4). Em maior número, ocorreu a exibição de perfis não coincidentes gerados pelas duas metodologias de PCR para uma mesma amostra (Tabela 14).

Do total de 43 isolados de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais no Rio de Janeiro e identificados taxonomicamente, a enzima recombinante detectou o gene *merA* em 32 isolados (74 %), enquanto a enzima Platinum® foi capaz de identificá-lo em 39 isolados (91 %). Nesta região, o perfil A1 foi o detectado com maior freqüência pela enzima recombinante (15 amostras) e o perfil B1 foi o mais identificado pela enzima Platinum® (5 amostras). Portanto, os perfis de amplificação mais freqüentes nas amostras bacterianas isoladas da região sudeste foram A1 (n = 17), B1 (n = 11) e A2 (n = 7).

De maneira similar, nos 9 isolados de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais do estado do Rio Grande do Sul, a enzima recombinante foi capaz de detectar o perfil A1 em 8 isolados, enquanto a enzima Platinum® identificou o gene em todas os isolados da região sul, com maior freqüência do perfil B1 (8 amostras) e a exibição do perfil D13 por um dos isolados bacterianos.

Das 35 amostras bacterianas isoladas de pontos de coleta caracterizados como de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes de mineração, localizados em Rondônia, a enzima Platinum® foi capaz de detectar um percentual superior (n = 32; 91 %) de amostras *merA* positivas quando comparada com a enzima recombinante (n = 23; 66 %). Novamente, o perfil detectado com maior freqüência pela enzima recombinante foi o A1 (10 amostras), enquanto o perfil D2 foi o mais identificado pela enzima Platinum® (12 amostras). Deste modo, os perfis de amplificação exibidos com maior freqüência pelas bactérias isoladas de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes de mineração na região norte foram D2 (n = 12), A1 (n = 10) e B2 (n = 7).

Isoladas da mesma região, porém de uma classe diferente de ponto de coleta, as amostras bacterianas oriundas de uma represa localizada em Rondônia (n = 15) apresentaram o mesmo número de amostras positivas (n = 13) como resultado da amplificação utilizando as enzimas recombinante e Platinum®. Nesse sistema aquático, o perfil identificado com maior freqüência pela enzima recombinante foi o A2, diferente do perfil mais exibido pela enzima Platinum® nas mesmas amostras, o perfil C15.

Assim, os perfis de amplificação detectados com maior freqüência nas bactérias isoladas de uma represa localizada na região norte foram A2 (n = 12), C15 (n = 7) e A1 (n = 4).

Ao final das análises de PCR nas bactérias isoladas de Rondônia, o perfil de amplificação A2 foi o mais frequentemente identificado (n = 18) no total de isolados bacterianos (n = 50) dos pontos de coleta localizados na região norte, seguido pelos perfis A1 (n = 14) e D2 (n = 12).

A pesquisa do gene *merA* utilizando a enzima recombinante nas 11 amostras bacterianas isoladas de pisciculturas localizadas no estado de Mato Grosso, amplificou o gene em 8 isolados, enquanto a enzima Platinum® apresentou resultado positivo para 9 bactérias isoladas da região. O perfil A1 foi o mais detectado pela enzima recombinante (n = 5) e pela enzima Platinum® (n = 2), porém esta última apresentou resultados positivos bastante dispersos entre os perfis de amplificação, apesar da pequena amostragem bacteriana.

Portanto, como resultado da observação da ocorrência dos perfis de amplificação em cada região geográfica estudada, notou-se que a região sudeste foi a que apresentou o maior número absoluto de perfis de amplificação diferentes (26 perfis), seguida pela região norte, que exibiu 18 perfis entre suas amostras. Por outro lado, uma das regiões com menor amostragem bacteriana, a centro-oeste, apresentou o maior número relativo de perfis: 10 perfis diferentes gerados pelos dois protocolos de PCR em 9 amostras positivas. Ao contrário, na região sul foi observada a ocorrência de apenas 3 perfis após a amplificação das 9 amostras de DNA bacteriano.

Quando analisamos os perfis de amplificação gerados com maior freqüência pelos isolados bacterianos deste estudo, vemos que além da diferença gerada pelo protocolo de PCR utilizado, os resultados também podem ser diferentes dependendo da região de origem da amostra.

A maioria dos isolados de *E. cloacae* de todas as regiões geográficas que apresentaram resultado positivo para a detecção do gene *merA* utilizando a enzima recombinante na reação, apresentaram o perfil de amplificação A1. Porém, os resultados gerados pela enzima Platinum® mostram uma grande diversidade de perfis entre os isolados das quatro regiões, que neste protocolo exibiram várias combinações de fragmentos de DNA diversos em número e tamanho.

Quanto aos isolados de *K. pneumoniae*, a maior diversidade de perfis de amplificação gerados foi observada nos isolados de áreas afetadas pelo lançamento de

efluentes da região sudeste e de pisciculturas da região centro-oeste. Nas amostras oriundas das regiões norte e sul, as combinações mais frequentes de fragmentos de DNA resultantes da PCR foram classificadas nos perfis A e B.

Os representantes do terceiro gênero bacteriano mais prevalente nas amostras isoladas, *Pantoea* sp., oriundas dos sistemas aquáticos das regiões norte, em sua maioria, e centro-oeste, apresentaram pouca diversidade de número e tamanho dos fragmentos de DNA amplificados pelos dois protocolos. A maior parte das amostras apresentou fragmentos do tamanho esperado conjugados a fragmentos de menor peso molecular.

Os demais gêneros e espécies bacterianos identificados (n = 8) foram representados por um pequeno número de isolados (entre 1 e 5) e em grande parte estes foram oriundos de uma única região geográfica. Entretanto, estes fatores não impediram que estas amostras apresentassem perfis de amplificação variados.

Todos os quatro isolados de enterobactérias que apresentaram valores de $CMI_{Hg}$ superiores a 20 μM – *R. terrigena* (25 μM) e L. *adecarboxylata* (30 μM), oriundos da região sudeste e *E. cloacae* (30 μM) e *K. pneumoniae* (30 μM), da região centro-oeste – apresentaram resultado positivo, inclusive com a presença do fragmento de DNA de 1234 pb descrito por Liebert *et al*. [56], quando os dois protocolos de PCR foram utilizados para a pesquisa do gene *merA*.

Comparativamente, os resultados obtidos pelos dois protocolos testados sugerem que eles apresentam indicações de uso diferentes. Enquanto a metodologia que utiliza a enzima recombinante mostrou-se mais específica e adequada para a detecção do fragmento do gene *merA* descrito por Liebert *et al*. [56], o protocolo que utiliza a enzima Platinum® pareceu mais sensível e indicada para a amplificação de sequências do gene *merA* que apresentem variações em sua estrutura nucleotídica, causadas possivelmente pela ocorrência de deleções ou inserções de pequenos fragmentos gênicos móveis. Assim, poderíamos dizer que o protocolo com a enzima recombinante poderia produzir mais falsos negativos, ou de outra forma, teria maior especificidade para o fragmento esperado. Enquanto que o segundo protocolo com a Taq Platinum® produziria menos falsos negativos, possuindo, portanto, maior sensibilidade para detectar fragmentos menores do gene *merA* mesmo quando ocorrem alterações nas suas sequências de nucleotídeos.

A observação de isolados bacterianos capazes de crescer em meios de cultura contendo concentrações elevadas de mercúrio, mas onde não foi possível detectar o gene *merA* utilizando os dois protocolos de PCR (n = 10; 9 %), pode ser explicada pela capacidade apresentada por alguns microrganismos de desenvolver outros mecanismos específicos de resistência ao mercúrio. Estes mecanismos podem resultar de propriedades intrínsecas do organismo, como a presença de membrana celular impermeável e a produção de polissacarídeos extracelulares, ou simplesmente da falta de um sistema especifico de transporte de metais para o interior das células [157].

**Tabela 14** – Perfis de Amplificação Gerados com Maior Frequência pelas Duas Metodologias de PCR.

| Perfil de Amplificação | | Isolado Bacteriano | Gênero / Espécie | Região Geográfica | Atividade / Impacto Antropogênico Predominante |
|---|---|---|---|---|---|
| Enzima Recombinante | Enzima Platinum® | | | | |
| **A1** | **B1** | M151 | *E. cloacae* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M154 | *E. cloacae* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M155 | *E. cloacae* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M158 | *E. coli* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M71 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M90 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M102 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M228 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M245 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M246 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M248 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M249 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M253 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M255 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M258 | *K. pneumoniae* | Sul (RS) | efluentes domésticos e industriais |
| **A1** | **D2** | M49 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M54 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M68 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M70 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M85 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração (continua) |

**Tabela 14** - Perfis de Amplificação Gerados com Maior Frequência pelas Duas Metodologias de PCR. (continuação)

| Perfil de Amplificação | | Isolado Bacteriano | Gênero / Espécie | Região Geográfica | Atividade / Impacto Antropogênico predominante |
|---|---|---|---|---|---|
| Enzima Recombinante | Enzima Platinum® | | | | |
| **A1** | **D2** | M86 | *E. cloacae* | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M87 | *Serratia* sp. | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| **A2** | **C15** | M105 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M108 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M117 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M118 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M120 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M122 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M123 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| **A1** | **A1** | M150 | *K. pneumoniae* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M159 | *K. oxytoca* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M283 | *E. cloacae* | Centro-Oeste (MT) | pisciculturas |
| | | M297 | *E. cloacae* | Centro-Oeste (MT) | pisciculturas |
| **A1** | **A2** | M26 | Aeromonas sp. | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M31 | *E. aerogenes* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M97 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| | | M115 | *Pantoea* sp. | Norte (RO) | represa |
| **A1** | **B2** | M149 | *Enterobacter* sp. | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M153 | *E. cloacae* | Sudeste (RJ) | efluentes domésticos e industriais |
| | | M88 | *Serratia* sp. | Norte (RO) | efluentes de mineração |
| | | M291 | *E. cloacae* | Centro-Oeste (MT) | pisciculturas |

## 4.10. Presença do Gene *merA* em Bactérias Resistentes ao Mercúrio e a Antimicrobianos

A maioria dos isolados de todos os sistemas aquáticos estudados apresentou resistência à Ampicilina, independente do perfil de amplificação resultante da PCR. Após avaliar a existência de uma possível associação entre os perfis de amplificação exibidos pelos isolados que apresentaram resultado positivo para a pesquisa do gene *merA* e os perfis de resistência a antimicrobianos apresentados pelos mesmos isolados, não foi possível observar esta associação na amostragem. Talvez isto possa ser, ao menos parcialmente justificado, pelo viés da amostragem, onde se buscou deliberadamente amostras com elevada resistência fenotípica ao Hg.

Por outro lado, foi possível observar que 91 % das amostras bacterianas multi-resistentes (n = 22) apresentaram resultado positivo para a amplificação do gene *merA*, sendo que em 18 % destas amostras foram detectados fragmentos com tamanhos diferentes de 1234 pb. Entre as amostras multi-resistentes e *merA*-positivas, 40 % (n = 4) foram resistentes a 4 antibióticos e 10 % (n = 1) foi resistente a 5 antibióticos simultaneamente.

Estes resultados corroboram os obtidos por Matyar *et al*. [141], que pesquisaram a associação entre a resistência a antibióticos e a metais tóxicos em amostras Gram-negativas isoladas de ambientes aquáticos. Os autores observaram altos índices de resistência à Ampicilina (93 %) e multi-resistência (2 a 16 antimicrobianos) em 57 % das amostras de *E. coli*, *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Acinetobacter* sp. e *Klebsiella* sp. resistentes a metais tóxicos, possivelmente como consequência da degradação dos ecossistemas devido à crescente carga antropogênica de nutrientes, metais, sais, produtos químicos orgânicos sintéticos e produtos de combustão [141,158].

## 4.11. Resultados do Sequenciamento dos Fragmentos do Gene *merA* Detectados nas Bactérias

Foram selecionados 13 isolados bacterianos para a análise da sequência do gene *merA*, a partir do total de isolados (n = 103) que apresentaram resultado positivo para a pesquisa do gene *merA* utilizando a técnica de PCR. A seleção foi baseada em 4 critérios: (1) pertencer aos gêneros bacterianos identificados com maior frequência na amostragem, (2) representar as diferentes categorias de pontos de coleta presentes neste estudo, (3) apresentar amplificação do DNA com a utilização de enzimas e protocolos de PCR diferentes e (4) exibir fragmentos do gene *merA* com tamanhos variados.

Todos os isolados resistentes ao mercúrio selecionados foram identificados como membros da família Enterobacteriaceae (*E. cloacae* (4), *K. pneumoniae* (3), *Pantoea* sp. (3), *E. coli* (2) e *Serratia* sp. (1)) e a maioria (77 %) apresentou resistência aos antimicrobianos. Apenas os três isolados de *Pantoea* sp. foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Dos 13 fragmentos amplificados submetidos ao sequenciamento de DNA, 6 foram detectados em isolados da região norte (3 oriundos de de áreas afetadas pelo lançamento efluentes de mineração e 3 de represa), 3 foram identificados em isolados oriundos de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais coletados na região sudeste, 2 foram obtidos de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes da região sul e 2 foram detectados em isolados de pisciculturas localizadas na região centro-oeste do país.

Quanto à presença do gene *merA*, 9 fragmentos de tamanhos variados (800 pb, 1200 pb e 1500 pb) foram amplificados com o emprego da enzima Platinum® e 4 fragmentos (com pesos de 1200 pb e 1500 pb) foram detectados em reações onde a enzima recombinante foi utilizada.

A análise comparativa dos resultados do sequenciamento dos fragmentos do gene *merA* identificados neste estudo foi realizada através da técnica de alinhamento múltiplo, utilizando a ferramenta de bioinformática T-COFFEE [131].

Inicialmente, as sequências gênicas das bactérias nativas foram comparadas com o fragmento-alvo [56] e a pontuação geral apresentada pelo alinhamento foi correspondente a 91 % de similaridade genética (Tabela 15). Esse alto percentual de similaridade genética demonstra a especificidade dos produtos de amplificação que apresentaram tamanhos diferentes do fragmento-alvo e sugere a presença de polimorfismos genéticos nas bactérias presentes nos ecossistemas estudados.

Quando a análise é feita individualmente de cada uma das 13 sequências do gene *merA* identificadas nas amostras bacterianas nativas com o fragmento-alvo, descrito por Liebert *et al*. [56], observou-se uma similaridade que variou entre 89 % e 93 %. Os maiores percentuais de similaridade (93 %) foram observados em sequências de 800 pb e 1500 pb extraídas de *E. cloacae* isoladas de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes de mineração e pisciculturas, além de sequências de *E. coli* (1500 pb) e *K. pneumoniae* (1200 pb) isoladas de áreas afetadas pelo lançamento de efluentes domésticos e industriais do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul, respectivamente.

**Tabela 15** – Similaridade Genética Apresentada pelos Fragmentos do Gene *merA* após o Sequenciamento.

| Amostra | Região Geográfica | Atividade / Impacto Antropogênico Predominante | $CMI_{Hg}$ | Identificação | TSA (perfil*) | Fragmento Analisado (pb) | Similaridade Apresentada entre as Amostras e o/a(s) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | Fragmento-alvo | Entre si | Amostras da mesma | |
| | | | | | | | | | Região | Espécie |
| M71 | Norte | Efluentes de mineração | 20 µM | *E. cloacae* | II | 1500 pb | 93 % | 95 % | 99 % | 97 % |
| M86 | | | 20 µM | *E. cloacae* | II | 1500 pb | 93 % | 95 % | 99 % | 97 % |
| M87 | | | 20 µM | *Serratia* sp. | II | 1500 pb | 92 % | 94 % | 99 % | - |
| M97 | | Represas | 20 µM | *Pantoea* sp. | S | 800 pb | 92 % | 94 % | 93 % | 93 % |
| M102 | | | 20 µM | *Pantoea* sp. | S | 1200 pb | 89 % | 92 % | 93 % | 93 % |
| M115 | | | 20 µM | *Pantoea* sp. | S | 1200 pb | 91 % | 92 % | 94 % | 94 % |
| M152 | Sudeste | Efluentes domésticos e industriais | 20 µM | *E. cloacae* | II | 1200 pb | 92 % | 94 % | 92 % | 95 % |
| M157 | | | 20 µM | *E. coli* | XVIII | 1500 pb | 93 % | 95 % | 95 % | 91 % |
| M158 | | | 20 µM | *E. coli* | XVIII | 1500 pb | 90 % | 92 % | 96 % | 99 % |
| M228 | Sul | | 20 µM | *K. pneumoniae* | II | 1200 pb | 92 % | 95 % | 98 % | 96 % |
| M258 | | | 20 µM | *K. pneumoniae* | VI | 1200 pb | 93 % | 95 % | 98 % | 95 % |
| M297 | Centro-Oeste | Pisciculturas | 20 µM | *E. cloacae* | XVII | 800 pb | 93 % | 94 % | 97 % | 97 % |
| M301 | | | 30 µM | *K. pneumoniae* | XVI | 1200 pb | 91 % | 94 % | 94 % | 95 % |

*Perfis apresentados no Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) – Perfil II: Resistência a Ampicilina; Perfil VI: Resistência a Ampicilina e Sulfametoxazol-Trimetoprim; Perfil XVI: Resistência a Ampicilina, Tetraciclina, Sulfametoxazol-Trimetoprim; Perfil XVII: Resistência a Ampicilina, Tetraciclina, Sulfametoxazol-Trimetoprim e Ácido Nalidíxico; Perfil XVIII: Resistência a Tetraciclina; Perfil S: Sensível a todos os antimicrobianos testados.

Quando as sequências nativas foram comparadas apenas entre si, a pontuação gerada a partir do alinhamento foi um pouco mais alta (94 %). Isso significa que as sequências nativas apresentam maior similaridade entre si e um maior número de divergências nucleotídicas em relação ao fragmento-alvo. Quanto à similaridade exibida pelas sequências do gene *merA* detectadas no total de amostras bacterianas brasileiras comparadas entre si, o percentual variou de 92 % a 95 %, com os valores mais altos apresentados por isolados de *E. cloacae* (RO), *K. pneumoniae* (RS) e *E. coli* (RJ).

Desta forma, foi possível observar altos percentuais de similaridade entre as sequências analisadas independente da região geográfica onde a amostra foi coletada, da espécie bacteriana, do protocolo de PCR utilizado e do tamanho do fragmento amplificado.

A manutenção do gene *merA* no genoma de bactérias isoladas de locais onde não há registros de contaminação por mercúrio reforça a hipótese da presença deste metal mesmo em ecossistemas distantes de quaisquer fontes naturais ou antropogênicas, devido ao seu transporte atmosférico eficiente por longas distâncias e sua persistência no ambiente.

Isso significa que todos os locais de coleta, independente de apresentarem um histórico conhecido de contaminação por mercúrio, possuem enterobactérias que carregam o gene *merA* em seu genoma, com a possibilidade de transferir este marcador de resistência, disseminando esta característica de resistência para outras bactérias da comunidade microbiana local, e em muitos casos carreando conjuntamente genes de resistências a antimicrobianos. Assim, estes organismos podem causar doenças à população local através de contaminação veiculada pela água dos sistemas aquáticos avaliados.

Estes resultados também indicam que a utilização dos dois protocolos de PCR testados é eficiente para a identificação do fragmento conservado do gene *merA* descrito por Liebert *et al*. [56]. Os resultados do sequenciamento indicam que a diferença entre os protocolos reside na relação "especificidade X sensibilidade" apresentada pelos resultados das reações. A PCR apresenta maior rendimento quando a enzima Platinum® é utilizada, gerando a amplificação de sequências do gene *merA* com maior número de variações nucleotídicas, enquanto com os parâmetros mais rígidos empregados no protocolo que utiliza a enzima recombinante, a maioria das sequências identificadas apresenta como tamanho a faixa de 1000 pb a 1500 pb apenas.

### 4.12. Presença de Polimorfismo no Gene *merA* das Bactérias

O alinhamento múltiplo construído com as sequências do gene *merA* identificadas nas amostras bacterianas brasileiras e a sequência descrita por Liebert *et al*. [56] mostrou um alto percentual de similaridade entre elas, variável entre 89 % e 93 %.

Porém, como pode ser observado no Anexo 7, foram detectadas divergências de nucleotídeos em várias regiões da sequência gênica do fragmento-alvo em relação aos isolados nativos quando foi realizado o alinhamento reverso, gerando um percentual de similaridade igual a 39 %. Estas divergências são observadas em menor número quando as sequências do gene *merA* identificadas nas bactérias isoladas são comparadas apenas entre elas, sem a presença do fragmento-alvo no alinhamento, como pode ser visualizado no Anexo 8, o que indica que a sequência identificada por Liebert *et al*. [56] apresenta maior divergência genética em relação às bactérias isoladas dos ecossistemas aquáticos brasileiros.

A partir da observação de maior identidade genética entre as sequências do gene *merA* detectadas nas bactérias nativas e a ocorrência de divergência da sequência descrita por Liebert *et al*. [56] em relação a nossas sequências, mostrou-se necessário investigar o polimorfismo dos genes *merA* identificados através da comparação com outras 149 sequências do gene *merA* identificadas em amostras bacterianas de diversas famílias e gêneros, isoladas de vários países e depositadas no *GenBank*, um banco de dados genéticos de livre acesso mantido pelo National Institute of Health (NIH, Estados Unidos / disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Para conhecermos o percentual de similaridade genética apresentado pelas sequências do gene *merA* identificadas em outros países, foi realizado um alinhamento múltiplo comparando as 149 sequências entre si. Como resultado, foram obtidos 46 % de similaridade entre as sequências, variando de 5 % a 54 % (Tabela 16). As sequências que apresentaram 5 % de similaridade genética neste alinhamento foram depositadas no *GenBank* por grupos de pesquisa da Finlândia (*Lactobacillus crispatus* isolado de microbiota intestinal de frango, em 2010) e da Alemanha (*Ilyobacter polytropus* isolado de sedimento marinho, em 2011), sendo o baixo percentual indicador de uma alta divergência em relação ao grupo de sequências submetido ao alinhamento.

Em seguida, realizamos o alinhamento múltiplo comparando as 13 sequências nativas do gene *merA* identificadas neste estudo com as 149 sequências selecionadas no

*GenBank*. A similaridade genética resultante da comparação entre as nossas sequências e as identificadas em bactérias isoladas em outros países apresentou percentuais muito baixos, variando entre 3 % e 6 %.

Devido a totalidade das amostras bacterianas nativas selecionadas para o sequenciamento de DNA pertencer à família Enterobacteriaceae, foi realizada uma minuciosa pesquisa no *GenBank* para acessar somente sequências depositadas oriundas de bactérias das mesmas espécies das bactérias nativas. Com isso, tivemos acesso a sequências de *E. coli* (n = 7), *E. cloacae* (n = 5), de *K. pneumoniae* (n = 3) e de *Serratia* sp. (n = 1) e processamos novos alinhamentos múltiplos para comparar as sequências nativas com essas depositadas.

Quando somente as sequências de *K. pneumoniae* foram comparadas, sendo 3 nativas e 3 depositadas, o percentual de similaridade obtido foi correspondente a 52 %. O alinhamento das sequências de *E. cloacae* (4 nativas e 5 depositadas) resultou em similaridade variável entre 23 % e 43 %, enquanto a partir da comparação das sequências de *Serratia* sp. (1 nativa e 1 depositada) obteve-se 38 % de similaridade. O alinhamento das sequências de *E. coli* (2 nativas e 7 depositadas) resultou no percentual mais baixo entre as espécies, variando entre 13 % e 28 %.

Contrariando a expectativa de que isolados bacterianos da mesma espécie oriundos de diferentes regiões do mundo teriam sequências do gene *merA* semelhantes, o percentual de similaridade apresentado pelas sequências brasileiras em relação às sequências bacterianas depositadas por outros autores foi bastante baixo, o que sugere a ocorrência de eventos genéticos como inserções e deleções durante a evolução do gene *merA* nas amostras bacterianas brasileiras ao longo dos anos que resultaram no polimorfismo genético observado neste estudo.

**Tabela 16** – Similaridade Genética Apresentada após o Alinhamento dos Fragmentos do Gene *merA* Identificados neste Estudo e as Sequências do Gene Depositadas no *GenBank*.

| Gênero / Espécie Bacteriana* | Nº de Sequências do gene *merA* Submetidas ao Alinhamento | | Similaridade Apresentada |
|---|---|---|---|
| | Obtidas neste Estudo | Depositadas no *GenBank* | |
| Diversos | - | 149 | 5 – 54 % |
| Diversos | 13 | 149 | 3 – 6 % |
| *K. pneumoniae* | 3 | 3 | 52 % |
| *E. cloacae* | 4 | 5 | 23 – 43 % |
| *E. coli* | 2 | 7 | 13 – 28 % |
| *Serratia* sp. | 1 | 1 | 38 % |

* Não foram depositadas no *GenBank* sequências do gene *merA* detectadas em isolados de *Pantoea* sp. até dezembro de 2011, o que impediu a realização do alinhamento.

Estes resultados indicam uma possível diversidade genética do gene *mer*A nas amostras analisadas dos diferentes ecossistemas aquáticos brasileiros. De acordo com Liebert *et al*. [56], os iniciadores utilizados se mostraram capazes de amplificar uma região conservada do gene *merA* em 97 % das amostras bacterianas Gram-negativas resistentes ao mercúrio estudadas. Porém, estudos recentes vêm relatando uma crescente variabilidade de sequências nucleotídicas identificadas em determinantes gênicos de resistência ao mercúrio presentes em bactérias ambientais isoladas em outros países [62,68,75,76].

Os sistemas aquáticos contendo águas residuais podem promover o desenvolvimento de comunidades bacterianas que reúnam diferentes tipos de elementos genéticos de resistência que, em associação, desempenham um papel importante na adaptação e evolução das bactérias [41].

Nestes ecossistemas poluídos as comunidades bacterianas são submetidas a processos de seleção e sua capacidade de adaptação está relacionada a transmissão vertical ou horizontal de genes de resistência [159]. Por isso, de acordo com McArthur e Tuckfield [160], as bactérias isoladas de uma mesma região podem apresentar seqüências gênicas diferentes, como resultado de pressões de seleção mais ou menos intensas em localizações espaciais específicas. Consequentemente seriam observados genes de composição variável ou em número variado de cópias na comunidade bacteriana local.

## 4.13. Significado dos Achados deste Estudo no Contexto da Poluição Ambiental, da Biorremediação e da Saúde Pública

A identificação do gene *merA* em bactérias isoladas dos diferentes pontos de coleta sugere que a presença de amostras bacterianas resistentes ao mercúrio pode ser ubíqua nos ecossistemas aquáticos brasileiros. A presença deste poluente em ecossistemas aquáticos que não possuem histórico de contaminação pode estar relacionada ao transporte atmosférico eficiente do mercúrio. Uma vez que o mercúrio lançado no ambiente exerce uma pressão seletiva nas comunidades biológicas, promovendo a seleção de bactérias resistentes, os ecossistemas impactados pelo mercúrio podem ser excelentes fontes de microrganismos para utilização em futuros processos de biorremediação das áreas contaminadas.

O isolamento e a caracterização de bactérias provenientes de ambientes contaminados por vários poluentes, como metais e poluentes orgânicos persistentes, oferecem a oportunidade de obtenção de organismos adaptados a condições ambientais extremas. Estes organismos são capazes de altas taxas de metabolismo e reprodução sob condições ambientais estressantes, possuindo baixos requerimentos nutricionais. Estas amostras foram naturalmente selecionadas pelas condições ambientais, possuindo as qualidades fundamentais para organismos destinados à biorremediação: grande resistência à poluição mista e condições fáceis de cultivo.

A variabilidade genética apresentada pelas amostras bacterianas isoladas dos ecossistemas aquáticos brasileiros reforça o que vem sendo relatado na literatura pelos estudos mais recentes sobre o gene *merA*, em contraposição aos primeiros estudos. Esta variabilidade pode ser explicada pela capacidade das bactérias de origem ambiental de se adaptar rapidamente às mudanças locais e responder aos seus estímulos através de mutações. Essas, por sua vez, podem ser estimuladas pela presença de metais tóxicos no ambiente, permitindo que os microrganismos resistentes se tornem prevalentes nas comunidades microbianas expostas aos poluentes [161].

É importante destacar que a avaliação da estrutura genética de populações ambientais impactadas pela presença de contaminantes antropogênicos pode ser uma ferramenta útil para o conhecimento das conseqüências decorrentes da exposição à poluição. Além disso, a alta similaridade genética entre os indivíduos da população microbiana estudada, oriunda de diferentes sistemas aquáticos, chama a atenção para a necessidade de um gerenciamento adequado dos resíduos industriais antes da descarga no meio ambiente visando à proteção de nossos ecossistemas e da saúde humana.

Finalizando, é importante considerarmos que os genomas são resultado de uma longa e contínua evolução. Também devemos lembrar que os conhecimentos atuais sobre a diversidade microbiana são escassos devido à impossibilidade de cultivar a maioria das bactérias ambientais. Com isso, a compreensão de como os genes e seus produtos interagem entre si e com o meio ambiente torna-se bastante complexa [44,159].

## 5. Conclusões

- Observou-se a presença de bactérias resistentes ao Hg em todos os pontos de coleta dos sistemas aquáticos, o que reforça a hipótese de que o Hg está presente no ambiente de maneira ubíqua, independente do histórico de contaminação das regiões, devido ao seu eficiente transporte atmosférico;
- Independente da região, foram isoladas espécies bacterianas com níveis de resistência ao Hg similares, entretanto as bactérias que apresentaram os níveis de resistência mais altos foram isoladas de áreas com histórico de contaminação mercurial;
- Houve isolamento de diversos gêneros bacterianos, porém, as enterobactérias foram isoladas com maior frequência dos sistemas aquáticos, indicando a presença de poluição fecal recente nos locais de coleta;
- Alguns isolados bacterianos resistentes ao Hg apresentaram divergências metabólicas em relação ao comportamento esperado, independente da região de origem, como resultado da grande capacidade adaptativa das bactérias a condições variáveis ou desfavoráveis no ambiente;
- A maioria das bactérias resistentes ao Hg isoladas foi resistente a antimicrobianos e cerca de 10 % foram multi-resistentes, o que pode ser decorrente da emissão crescente de antimicrobianos no ambiente, devido ao uso indiscriminado na medicina e na agricultura, contribuindo para a seleção e disseminação de bactérias resistentes e representando um grave problema de saúde pública;
- O gene *merA* foi detectado em 91 % das bactérias isoladas, indicando que este mecanismo de resistência ao Hg seja o mais comum na população bacteriana estudada;
- Os dois protocolos de PCR utilizados mostraram-se simples e eficientes para a detecção do gene *merA* em bactérias Gram-negativas ambientais e podem ser empregados na prospecção de bactérias para futuras iniciativas de biorremediação da poluição por Hg;

- O polimorfismo apresentado pelo gene *merA* nas bactérias nativas sugere a ocorrência de eventos genéticos simples como inserções, substituições e deleções durante a evolução do gene *merA* nas amostras bacterianas brasileiras ao longo dos anos;
- A maior similaridade do gene *merA* foi apresentada entre bactérias isoladas de uma mesma região do nosso país, independente da espécie identificada, possivelmente como resultado da transferência horizontal de genes de resistência estimulada por pressões seletivas em localizações espaciais específicas;
- A alta similaridade genética apresentada pelos indivíduos da população microbiana estudada chama a atenção para a necessidade de um gerenciamento adequado dos resíduos industriais antes da descarga no meio ambiente, visando à proteção dos ecossistemas e da saúde humana.

## 6. Recomendações

- Selecionar e caracterizar bactérias provenientes de outros ecossistemas aquáticos, buscando microrganismos com grande resistência à poluição mista e condições fáceis de cultivo, que possam ser futuramente empregados em processos de biorremediação;
- Sequenciar os fragmentos do gene *merA* detectados em todos os isolados das regiões geográficas estudadas, a fim de verificar a existência de perfis genéticos relacionados às amostras regionais;
- Desenvolver novos iniciadores específicos para a detecção do gene *merA*, com menor tamanho e baseados nas sequências genéticas apresentadas pelas bactérias isoladas dos sistemas aquáticos brasileiros;
- Pesquisar a presença do gene *merA* em elementos genéticos móveis e testar a possibilidade de transferência desse gene utilizando experimentos de conjugação bacteriana;
- Verificar o espectro de resistência dos isolados bacterianos caracterizados neste estudo, a partir da exposição ao Hg orgânico e/ou da detecção do gene *merB*, dando continuidade ao processo de seleção de bactérias visando o seu uso em ações de biorremediação;
- Comparar os genes *merA* e *merB* detectados submetendo os amplicons previamente à técnica de RFLP (Análise do Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição do DNA), mais simples e econômica que o sequenciamento de DNA, contribuindo para a compreensão da dinâmica da resistência ao Hg nas bactérias isoladas dos ecossistemas aquáticos brasileiros.

## 7. Referências Bibliográficas


1. Câmara VM, Tambellini AT. Considerações sobre o Uso da Epidemiologia nos Estudos em Saúde Ambiental. Revista Brasileira de Epidemiologia 2003; 6:95-104.
2. Celere MS, Oliveira AS, Trevilato TMB, Segura-Muñoz SI. Metais Presentes no Chorume Coletado no Aterro Sanitário de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, e sua Relevância para Saúde Pública. Cadernos de Saúde Pública 2007; 23:939-947.
3. Zahir F, Rizwi SJ, Haq SK, Khan RW. Low Dose Mercury Toxicity and Human Health. Environmental Toxicology and Pharmacology 2005; 20:351–360.
4. Jan AT, Murtaza I, Ali A, Haq QMR. Mercury Pollution: an Emerging Problem and Potential Bacterial Remediation Strategies. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2009; 25:1529-1537.
5. Hobman JL, Brown NL. Bacterial Mercury Resistance Genes. Metal Ions in Biological Systems 1997; 34:527-568.
6. Nascimento ES, Chasin AAM. Ecotoxicologia do Mercúrio e seus Compostos. Cadernos de Referência Ambiental 2001; volume 1.
7. United Nations Environment Programme. Mercury in the Aquatic Environment: Sources, Releases, Transport and Monitoring. Division of Technology, Industry and Economics (DTIE) Chemicals Branch, Geneva, Switzerland. 2011.
8. Pirrone N, Cinnirella S, Feng X, Finkelman RB, Friedli HR, Leaner J, Mason R, Mukherjee AB, Stracher GB, Streets DG, Telmer K. Global Mercury Emissions to the Atmosphere from Anthropogenic and Natural Sources. Atmospheric Chemistry and Physics 2010; 10:5951-5964.
9. Ferreira RCH, Appel LE. Fontes e Usos de Mercúrio no Brasil. 2ª edição. Rio de Janeiro: CETEM/CNPq. 1991.
10. United Nations Environment Programme. Summary of Supply, Trade and Demand Information on Mercury. Requested by UNEP Governing Council decision 23/9 IV. Geneva, Switzerland. 2006.
11. Von Canstein H, Li Y, Wagner-Döbler I. Long-term Performance of Bioreactors Cleaning Mercury-contaminated Wastewater and Their Response to Temperature and Mercury Stress and Mechanical Perturbation. Biotechnology and Bioengineering 2001; 74:212-219.
12. Wu G, Kang H, Zhang X, Shao H, Chu L, Ruan C. A Critical Review on the Bio-removal of Hazardous Heavy Metals from Contaminated Soils: Issues, Progress,

Eco-environmental Concerns and Opportunities. Journal of Hazardous Materials 2010; 174:1–8.

13. Narita M, Yamagata T, Ishii H, Huang C. Simultaneous Detection and Removal of Organomercurial Compounds by Using the Genetic Expression System of an Organomercury Lyase from the Transposon TnMERI1. Applied Microbiology and Biotechnology 2002; 59:86-90.
14. Câmara VM, Filhote MIF, Lima MIM, Alheira FV, Martins MS, Dantas TO, Luiz RR. Metodologia para Prevenir Exposição ao Mercúrio em Adolescentes de Garimpos de Ouro em Mariana, Minas Gerais, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 1996; 12:149-158.
15. Crespo-López ME, Macêdo GL, Pereira SID, Arrifano GPF, Picanço-Diniz DLW, Nascimento JLM, Herculano AM. Mercury and Human Genotoxicity: Critical Considerations and Possible Molecular Mechanisms. Pharmacological Research 2009; 60:212–220.
16. Lacerda LD. Updating Global Mercury Emissions from Smallscale Gold Mining and Assessing its Environmental Impacts. Environmental Geology 2003; 43:308-314.
17. Inácio MM, Pereira V, Pinto MS. Mercury Contamination in Sandy Soils Surrounding an Industrial Emission Source (Estarreja, Portugal). Geoderma 1998; 85:325-339.
18. Brasil. Lei ordinária n° 9.976, de 04 de julho de 2000. Dispõe sobre a Produção de Cloro e dá Outras Providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. 21 de Outubro de 2002.
19. Neustadt J, Pieczenik S. Heavy-Metal Toxicity – With Emphasis on Mercury. Integrative Medicine 2007; 6:26-32.
20. Patrick L. Mercury Toxicity and Antioxidants: Part I: Role of Glutathione and Alpha-Lipoic Acid in the Treatment of Mercury Toxicity. Alternative Medicine Review 2002; 7:456-471.
21. Cano SE. Toxicología del Mercurio. Actuaciones Preventivas en Sanidad Laboral y Ambiental. In: Jornada Internacional sobre el Impacto Ambiental del Mercúrio Utilizado por la Minería Aurífera Artesanal em Iberoamérica, Lima, Perú. 2001.
22. Clifton JC. Mercury Exposure and Public Health. Pediatric Clinics of North America 2007; 54: 237–269.

23. Clements CJ, Ball LK, Ball R, Pratt RD. Thimerosal in Vaccines. Lancet 2000; 355(9211):1279–1280.
24. Geier MR, Geier DA. Neurodevelopmental Disorders after Thimerosal-containing Vaccines: a Brief Communication. Experimental Biology and Medicine 2003; 228:660–4.
25. Counter SA, Buchanan LH. Mercury Exposure in Children: a Review. Toxicology and Applied Pharmacology 2004; 198:209 – 230.
26. Parker SK, Schwartz B, Todd J, Pickering LK. Thimerosal-containing Vaccines and Autistic Spectrum Disorder: a Critical Review of Published Original Data. Pediatrics 2004; 114:793–804.
27. Silbergeld EK. Mercury, Vaccines, and Autism, Revisited. American Journal of Public Health 2008; 98:1350.
28. Baker JP. Mercury, Vaccines, and Autism - One Controversy, Three Histories. American Journal of Public Health 2008; 98:244-253.
29. Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie D. Distribution, Diversity and Evolution of the Bacterial Mercury Resistance (mer) Operon. FEMS Microbioloy Reviews 1997; 19:239-262.
30. Nascimento AMA, Chartone-Souza E. Operon mer: Bacterial Resistance to Mercury and Potential for Bioremediation of Contaminated Environments. Genetics and Molecular Research 2003; 2:92-101.
31. Mason RP, Reinfelder JR, Morel FMM. Uptake, Toxicity and Trophic Transfer of Mercury in a Coastal Diatom. Environmental Science and Technology 1996; 30:1835-1845.
32. Morel FMM, Kraepiel AML, Amyot M. The Chemical Cycle and Bioaccumulation of Mercury. Annual Review Ecology Systematic 1998; 29:543-566.
33. Azevedo JL. Genética de Microrganismos. Goiânia: Ed. UFG. 1998.
34. Trabulsi LR, Alterthum F. Microbiologia. 4ª ed. São Paulo: Atheneu. 2005.
35. Hassen A, Saidi N, Cherif M, Boudabous A. Resistance of Environmental Bacteria to Heavy Metals. Bioresource Technology 1998; 64:7-15.
36. Nascimento AMA, Campos CEP, Campos EP, Azevedo JL, Chartone-Souza E. Re-evaluation of Antibiotic and Mercury Resistance in *Escherichia coli* Populations Isolated in 1978 from Amazonian Rubber Tree Tappers and Indians. Research of Microbiology 1999; 150:407−411.

37. Gadd GM. Metals, Minerals and Microbes: Geomicrobiology and Bioremediation. Microbiology 2010; 156:609-643.
38. Giovanella P, Bento F, Cabral L, Gianello C, Camargo FAO. Isolamento e Seleção de Micro-organismos Resistentes e Capazes de Volatilizar Mercúrio. Química Nova 2011; 34:232-236.
39. van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of Resistance to Antibiotics Links Between Animals and Humans. International Journal of Antimicrobial Agents 2000; 14:327-335.
40. Baker-Austin C, Wright MS, Stepanauskas R, McArthur JV. Co-selection of Antibiotic and Metal Resistance. TRENDS in Microbiology 2006; 14:176-182.
41. Rahube TO, Yost CK. Antibiotic Resistance Plasmids in Wastewater Treatment Plants and their Possible Dissemination into the Environment. African Journal of Biotechnology 2010; 9:9183-9190.
42. Zaha A. (org.). Biologia Molecular Básica. 3ed. Porto Alegre: Editora Mercado Aberto. 2003.
43. Malik A, Celik EK, Bohn C, Böckelmann U, Knobel K, Grohmann E. Detection of Conjugative Plasmids and Antibiotic Resistance Genes in Anthropogenic Soil from Germany and India. FEMS Microbiology Letters 2008; 279:207–216.
44. Anjum R, Grohmann E, Malik A. Molecular Characterization of Conjugative Plasmids in Pesticide Tolerant and Multi-Resistant Bacterial Isolates from Contaminated Alluvial Soil. Chemosphere 2011; 84:175-81.
45. Tobor-Kaplan MA, Bloem J, Römkens PFA, Ruiter PCD. Functional Stability of Microbial Communities in Contaminated Soils Near a Zinc Smelter (Budel, The Netherlands). Ecotoxicology 2006; 15:187–195.
46. Sun Q, He ZL, Yang XE, Shentu JL. Microbiological Response to Copper Contamination of a Paddy Soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 2007; 78:469–473.
47. Yin H, Cao L, Qiu G, Wang D, Kellogg L, Zhou J, Liu X, Dai Z, Ding J, Liu X. Molecular Diversity of 16S rRNA and *gyrB* Genes in Copper Mines. Archives of Microbiology 2008; 189:101–110.
48. Ali N, Hamee A, Ahme S. Physicochemical Characterization and Bioremediation Perspective of Textile Effluent, Dyes and Metals by Indigenous Bacteria. Journal of Hazardous Materials 2009; 16:322–328.

49. Sorkhoh NA, Dashti AN, Al-Mailem DM, Al-Awadhi H, Eliyas HM, Radwan SS. Soil Bacteria with the Combined Potential for Oil Utilization, Nitrogen Fixation, and Mercury Resistance. International Biodeterioration and Biodegradation 2010; 64:226-231.
50. Pan-Hou HSK, Nishimoto M, Imura N. Possible Role of Membrane Proteins in Mercury Resistance of *Enterobacter aerogenes*. Archives in Microbiology 1981; 30:93-95.
51. Silver S, Misra TK. Bacterial Transformations of and Resistances to Heavy Metals. Basic Life Science 1984; 28:23-46.
52. Trevors JT. Mercury Methylation by Bacteria. Journal of Basic Microbiology 1986; 26:499-504.
53. Barkay T, Liebert C, Gillman M. Conjugal Gene Transfer to Aquatic Bacteria Detected by the Generation of a New Phenotype. Applied and Environmental Microbiology 1993; 59:807-814.
54. Ojo KK, Tung D, Luis H, Bernardo M, Leitão J, Roberts MC. Gram-positive *merA* Gene in Oral and Urine Bactéria. FEMS Microbiological Letters 2004; 238:411-416.
55. Kholodi GY, Yurieva OV, Lomovskaya OL, Gorlenko ZM, Mindlin SZ, Nikiforov VG. Tn*5053*, a Mercury Resistance Transposon with Integron Ends. Journal of Molecular Biology 1993; 230:1103–1107.
56. Liebert CA, Wireman J, Smith T, Summers AO. Phylogeny of Mercury Resistance (*mer*) Operons of Gram-negative Bacteria Isolated from the Fecal Flora of Primates. Applied Environmental Microbiology 1997; 63:1066-1076.
57. Griffin HG, Foster TJ, Silver S, Misra TK. Cloning and DNA Sequence of Mercuric and Organomercurial Resistance Determinants of Plasmid pDU1358. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 1987; 84:3112–3116.
58. Radstrom P, Skold O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundstrom J. Transposon Tn*5090* of Plasmid R751, Which Carries Integron, is Related to Tn*7*, Mu and Retroelements. Journal of Bacteriology 1994; 176:3257–3268.
59. Barkay T, Miller SM, Summers AO. Bacterial Mercury Resistance from Atoms to Ecosystems. FEMS Microbiology Reviews 2003; 27:355-384.
60. Wang Y, Moore M, Levinson HS, Silver S, Walsh C, Mahler I. Nucleotide Sequence of a Chromosomal Mercury Resistance Determinant from a *Bacillus* sp.

With Broad-Spectrum Mercury Resistance. Journal of Bacteriology 1989; 171:83-92.

61. Inoue C, Sugawara K, Kusano T. *merR* Regulatory Gene in *Thiobacillus ferrooxidans* is Spaced Apart from the mer Structural Genes. Molecular Microbiology 1991; 5:2707–2718.
62. Rasmussen LD, Zawadsky C, Binnerup SJ, Øregaard G, Sørensen SJ, Kroer N. Cultivation of Hard-To-Culture Subsurface Mercury-Resistant Bacteria and Discovery of New *merA* Gene Sequences. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74:3795–3803.
63. Lal D, Lal R. Evolution of Mercuric Reductase (*merA*) Gene: A Case of Horizontal Gene Transfer. Microbiology 2010; 79:500–508.
64. Summers AO. Organization, Expression and Evolution of Genes for Mercury Resistance. Annual Review of Microbiology 1986; 40:607-634.
65. Huang C, Narita M, Yamagata T, Endo G. Identification of the Three *merB* Genes and Characterization of a Broad-spectrum Mercury Resistance Module Encoded by a Class II Transposon of *Bacillus megaterium* Strain MB1. Gene 1999; 239:361-366.
66. Kiyono M, Pan-Hou H. The *merG* Gene Product is Involved in Phenylmercury Resistance in *Pseudomonas* Strain K-62. Journal of Bacteriology 1999; 181:726-730.
67. Wilson JR, Leang C, Morby AP, Hobman JL, Brown NL. MerF is a Mercury Transport Protein: Different Structures but a Common Mechanism for Mercuric Ion Transporters? FEBS Letters 2000; 472:78-82.
68. Chien M-F, Narita M, Lin K-H, Matsui K, Huang C-C, Endo G. Organomercurials removal by Heterogeneous *merB* Genes Harboring Bacterial Strains. Journal of Bioscience and Bioengineering 2010; 110:94-98.
69. Liebert CA, Watson AL, Summers AO. The Quality of *merC*, a Module of the *mer* Mosaic. Journal of Molecular Evolution 2000; 51:607-622.
70. Barkay T, Gillman M, Liebert C. Genes Encoding Mercuric Reductases from Selected Gram-Negative Aquatic Bacteria Have a Low Degree of Homology with *merA* of Transposon Tn*501*. Applied and Environmental Microbiology 1990; 56:1695-1701.

71. Selifonova O, Burlage R, Barkay T. Bioluminescent Sensors for Detection of Bioavailable Hg (II) in the Environment. Applied and Environmental Microbiology 1993; 59:3083-3090.
72. Selifonova O, Barkay T. Role of $Na^{+}$ in Transport of $Hg^{2+}$ and Induction of the Tn*21 mer* Operon. Applied and Environmental Microbiology 1994; 60:3503-3507.
73. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon Tn*21*, Flagship of the Floating Genome. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1999; 63:507-522.
74. Felske ADM, Fehr W, Pauling BV, von Canstein H, Wagner-Dobler I. Functional Profiling of Mercury Reductase (*merA*) Genes in Biofilm Communities of a Technical Scale Biocatalyzer. BMC Microbiology 2003;3:22.
75. Oregaard G, Sørensen SJ. High Diversity of Bacterial Mercuric Reductase Genes from Surface and Sub-surface Floodplain Soil (Oak Ridge, USA). The International Society for Microbial Ecology Journal 2007; 1:453–467.
76. Wang Y, Freedman Z, Lu-Irving P, Kaletsky R, Barkay T. An Initial Characterization of the Mercury Resistance (*mer*) System of the Thermophilic Bacterium *Thermus thermophilus* HB27. FEMS Microbiology Ecology 2009; 67:118–129.
77. Moura A, Henriques I, Smalla K, Correia A. Wastewater Bacterial Communities Bring Together Broad-host Range Plasmids, Integrons and a Wide Diversity of Uncharacterized Gene Cassettes. Research in Microbiology 2010; 161:58-66.
78. Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of Medicine 2006; 119:S3–S10.
79. Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. Quimica Nova 2010; 33:667-679.
80. Heuer H, Krogerrecklenfort E, Wellington EMH, Egan S, van Elsas JD, van Overbeek L, Collard JM, Guillaume G, Karagouni AD, Nikolakopoulou TL, Smalla K. Gentamicin Resistance Genes in Environmental Bacteria: Prevalence and Transfer. FEMS Microbiology Ecology 2002; 42:289-302.
81. Davis IJ, Roberts AP, Ready D, Richards H, Wilson M, Mullany P. Linkage of a Novel Mercury Resistance Operon with Streptomycin Resistance on a Conjugative Plasmid in *Enterococcus faecium*. Plasmid 2005; 54:26–38.

82. Ready D, Pratten J, Mordan N, Watts E, Wilson M. The Effect of Amalgam Exposure on Mercury- and Antibiotic-resistant Bacteria. International Journal of Antimicrobial Agents 2007; 30:34–39.
83. Silveira GP, Nome F, Gesser JC, Sá MM. Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana. Química Nova 2006; 29:844-855.
84. Baquero F, Martınez JL, Canto R. Antibiotics and Antibiotic Resistance in Water Environments. Current Opinion in Biotechnology 2008; 19:260–265.
85. Lilley AK, Bailey MJ, Day MJ, Fry JC. Diversity of Mercury Resistance Plasmids Obtained by Exogenous Isolation from the Bacteria of Sugar Beet in Three Successive Years. FEMS Microbiology Ecology 1996; 20:211-227.
86. Tonomura K, Nakagami T, Futai F, Maeda K. Studies on the Action of Mercury-resistant Microorganisms on Mercurials. (1) The Isolation of Mercury-resistant Bacterium and the Binding of Mercurials to the Cells. Journal of Fermentation Technology 1968; 46:506–512.
87. Groves DJ, Young FE. Epidemiology of Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria: Resistance Patterns in Staphylococci Isolated from Populations Not Known to be Exposed to Heavy Metals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1975; 7:614-621.
88. Summers AO, Silver S. Mercury Resistance in a Plasmid-Bearing Strain of *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 1972; 112:1228-1236.
89. Summers AO, Lewis E. Volatilization of Mercuric Chloride by Mercury-resistant Plasmid-bearing Strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 1973; 113:1070-1072.
90. Clark DK, Weiss AA, Silver S. Mercury and Organomercurial Resistance Determined by Plasmid in *Pseudomonas*. Journal of Bacteriology 1977; 132:186–196.
91. Weiss AA, Murphy SD, Silver S. Mercury and Organomercurial Resistance Determined by Plasmid in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 1977; 132:197–208.
92. Fox B, Walsh CF. Mercuric Reductase: Purification and Characterization of a Transposed Flavoprotein Containing an Oxidation-Reduction-Active Disulfide. Journal of Biological Chemistry 1982; 257:2498-2503.
93. Misra TK, Brown NL, Fritzinger DC, Pridmore RD, Barnes WM. The Mercuric-ion Resistance Operons of Plasmid R100 and Transposon Tn*501*: the Beginning of the

Operon Including the Regulatory Region and the First Two Structural Genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America 1984; 81:5975-5979.

94. Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG, Maurer JJ. Incidence and Characterization of Integrons, Genetic Elements Mediating Multiple-Drug Resistance, in Avian *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999; 43:2925–2929.
95. Ramond JB, Berthe T, Duran R, Petit F. Comparative Effects of Mercury Contamination and Wastewater Effluent Input on Gram-negative *merA* Gene Abundance in Mudflats of an Anthropized Estuary (Seine, France): a Microcosm Approach. Research in Microbiology 2009; 160:10-8.
96. Lapanje A, Zrimec A, Drobne D, Rupnik M. Long-term Hg Pollution-induced Structural Shifts of Bacterial Community in the Terrestrial Isopod (*Porcellio scaber*) Gut. Environmental Pollution 2010; 158:3186-3193.
97. Cavalcanti AD. Monitoramento da Contaminação por Elementos Traço em Ostras Comercializadas em Recife, Pernambuco, Brasil. Cadernos de Saúde Pública 2003; 19:1545-1551.
98. Windmöller CC, Santos RC, Athayde M, Palmieri HEL. Distribuição e Especiação de Mercúrio em Sedimentos de Áreas de Garimpo de Ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG). Química Nova 2007; 30:1088-1094.
99. Almeida MD, Marins RV, Paraquetti HHM, Bastos WR, Lacerda LD. Mercury Degassing from Forested and Open Field Soils in Rondônia, Western Amazon, Brazil. Chemosphere 2009; 77:60–66.
100. Borges AC, Sanders CJ, Santos HLR, Araripe DR, Machado W, Patchineelam SR. Eutrophication History of Guanabara Bay (SE Brazil) Recorded by Phosphorus Fux to Sediments from a Degraded Mangrove Area. Marine Pollution Bulletin 2009; 58:1739–1765.
101. Fragomeni LPM, Roisenberg A, Mirlean N. Poluição por Mercúrio em Aterros Urbanos do Período Colonial no Extremo Sul do Brasil. Quimica Nova 2010; 33:1631-1635.
102. Del Lama SN, Rocha CD, Jardim WF, Tsai JS, Frederick PC. Sedentary Nestlings of Wood Stork as Monitors of Mercury Contamination in the Gold Mining Region of the Brazilian Pantanal. Environmental Research 2011; 111:1091-1095.

103. Dias JCAR, Ernandez D, Silva AAL, Oliveira LMRR, Silva SEA. Antimicrobial and Mercury Chloride Resistance in *Vibrio* Isolates from Marine Fish of the Southeastern Brazilian Region. Revista de Microbiologia 1995; 26:253-259.

104. Dias JCAR, Vicente ACP, Hofer E. Coliformes Fecais em Águas de Esgoto: I. Resistência a Antibióticos, Metais Pesados e Colicinogenia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1987; 82:335-343.

105. Nogueira RSP, Dias JCAR, Hofer E. Sorotipos de *Salmonella* de Efluente de Esgoto: Níveis de Resistência a Metais Pesados e Transferência de Marcadores. Revista de Microbiologia 1993; 24:9-15.

106. Cardonha AMS, Vieira RHSF, Rodrigues DP, Macrae A, Peirano G, Teophilo GND. Fecal Pollution in Water from Storm Sewers and Adjacent Seashores in Natal, Rio Grande do Norte, Brazil. International Microbiology 2004; 7:213-218.

107. Lima-Bittencourt CI, Astolfi-Filho S, Chartone-Souza E, Santos FR, Nascimento AMA. Analysis of *Chromobacterium* sp. Natural Isolates from Different Brazilian Ecosystems. BMC Microbiology 2007; 7:58.

108. Pontes DS, Pinheiro FA, Lima-Bittencourt CI, Guedes RLM, Cursino L, Barbosa F, Santos FR, Chartone-Souza E, Nascimento AMA. Multiple Antimicrobial Resistance of Gram-Negative Bacteria from Natural Oligotrophic Lakes Under Distinct Anthropogenic Influence in a Tropical Region. Microbial Ecology 2009; 58:762 –772.

109. Vicente ACP, Dias JCAR, Hofer E. Coliformes Fecais em Águas de Esgoto: II - Transferência de Marcadores e Presença de Plasmidios. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1988; 83:29-35.

110. Sotero-Martins A, Jesus MS, Lacerda M, Moreira JC, Filgueiras ALL, Barrocas PRG. A Conservative Region of the Mercuric Reductase Gene (*merA*) as a Molecular Marker of Bacterial Mercury Resistance. Brazilian Journal of Microbiology 2008; 39:307-310.

111. Zeyaullah Md., Atif M, Islam B, Abdelkafe AS, Sultan P, ElSaady MA, Ali A. Bioremediation: A Tool for Environmental Cleaning. African Journal of Microbiology Research 2009; 3:310-314.

112. Oehmen A, Fradinho J, Serra S, Carvalho G, Capelo JL, Velizarov S, Crespo JG, Reis MAM. The Effect of Carbon Source on the Biological Reduction of Ionic Mercury. Journal of Hazardous Materials 2009; 165:1040–1048.

113. Guo HB, Johs A, Parks JM, Olliff L, Miller SM, Summers AO, Liang L, Smith JC. Structure and Conformational Dynamics of the Metalloregulator MerR upon Binding of Hg (II). Journal of Molecular Biology 2010; 398:555-568.
114. Pietzsch R, Patchineelam SR, Torres JPM. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Recent Sediments from a Subtropical Estuary in Brazil. Marine Chemistry 2010; 118:56-66.
115. Linhares DP, Silva JM, Lima TR, Oliveira RC, Gomes JPO, Bastos WR, Silveira EG. Mercury Concentration in Margin Soil of the Madeira River. Sociedade & Natureza 2005; Special Issue, May, 369-379.
116. Bernini H, Marini GBS, Silva-Filho EP, Ferreira M. Monitoramento do Desmatamento no período de 2000 a 2007 na Floresta Nacional do Bom Futuro - Estudo de Caso Linha 2 da Zona Vila do Rio Pardo. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Natal-RN. 2009.
117. Farias RA, Hacon S, Campos RC, Argento R. Mercury Contamination in Farmed Fish Setup on Former Garimpo Mining Areas in the Northern Mato Grosso State, Amazonian Region, Brazil. Science of the Total Environment 2005; 348:128 – 134.
118. Niencheski LF, Windom HL, Baraj B, Wells D, Smith R. Mercury in Fish from Patos and Mirim Lagoons, Southern Brazil. Marine Pollution Bulletin 2001; 42:1403-1406.
119. Ramaiah N, De J. Unusual Rise in Mercury Resistant Bacteria in Coastal Environments. Microbial Ecology 2003; 45:444-454.
120. Vasconcellos ACS. Estudo da Resistência Bacteriana ao Mercúrio em Cepas Provenientes do Sistema da Baía de Guanabara. Monografia apresentada no Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ. 2006.
121. Andrews JM. Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2001; 48:5-16.
122. Barkay T. Adaptation of Aquatic Microbial Communities to $Hg^{+2}$ Stress. Applied and Environmental Microbiology 1987; 53:2725-2732.
123. Rasmussen LD, Sorensen SJ. The Effect of Long-term Exposure to Mercury on the Bacteria Community in the Marine Sediment. Current Microbiology 1998; 36:291-297.

124. Reyes NS, Frischer ME, Sobecky PA. Characterization of Mercury Resistance Mechanisms in Marine Sediment Microbial Communities. FEMS Microbiology Ecology 1999; 30:273-284.

125. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. American Journal of Clinical Pathology 1966; 45:493-496.

126. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard — Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

127. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

128. Sambrook J, Maniatis T, Fritch EF. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Press, 1:9-20. 1989.

129. Sanger F, Nicklen S, Coulson R. DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1977; 74:5463-5467.

130. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic Local Alignment Search Tool. Journal of Molecular Biology 1990; 215:403-10.

131. Notredame C, Higgins DG, Heringa J. T-COFFEE: A Novel Method for Fast and Accurate Multiple Sequence Alignment. Journal of Molecular Biology 2000; 302:205–217.

132. Poirot O, O'Toole E, Notredame C. Tcoffee@igs: a Web Server for Computing, Evaluating and Combining Multiple Sequence Alignments. Nucleic Acids Research 2003; 31:3503–3506.

133. Di Tommaso P, Moretti S, Xenarios I, Orobitg M, Montanyola A, Chang J-M, Taly J, Notredame C. T-Coffee: a Web Server for the Multiple Sequence Alignment of Protein and RNA Sequences Using Structural Information and Homology Extension. Nucleic Acids Research 2011; 39: Web Server issue W13–W17.

134. Bastos WR, Rebello MF, Fonseca MF, Almeida R, Malm O. A Description of Mercury in Fishes from the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. Acta Amazonica 2008; 38:431 – 438.

135. Silver S, Phung LT. Bacterial Heavy Metal Resistance: New Surprises. Annual Review of Microbiology 1996; 50:753-789.
136. Barkay T, Poulain AJ. Mercury (Micro)Biogeochemistry in Polar Environments. FEMS Microbiology Ecology 2007; 59: 232–241.
137. Dommergue A, Sprovieri F, Pirrone N, Ebinghaus R, Brooks S, Courteaud J, Ferrari CP. Overview of Mercury Measurements in the Antarctic Troposphere. Atmospheric Chemistry and Physics 2010; 10:3309–3319.
138. Piotrowska-Seget Z, Cyon M, Kozdroj J. Metal-tolerant Bacteria Occurring in Heavily Polluted Soil and Mine Spoil. Applied Soil Ecology 2005; 28:237–246.
139. Hafez EE, Elbestawy E. Molecular Characterization of Soil Microorganisms: Effect of Industrial Pollution on Distribution and Biodiversity. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2008; 25:215-224.
140. Rezzonico F, Smits THM, Montesinos E, Frey JE, Duffy B. Genotypic Comparison of *Pantoea agglomerans* Plant and Clinical Strains. BMC Microbiology 2009; 9:204.
141. Matyar F, Kayab A, Dinçer S. Antibacterial Agents and Heavy Metal Resistance in Gram-negative Bacteria Isolated from Seawater, Shrimp and Sediment in Iskenderun Bay, Turkey. Science of the Total Environment 2008; 407:279 – 285.
142. McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, Zalinger ZB, Gilg IC, Danner GR, Johnson KA, Beattie M, Ritchie R. Transferable, Multiple Antibiotic and Mercury Resistance in Atlantic Canadian Isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. Salmonicida is Associated with Carriage of an IncA/C Plasmid Similar to the *Salmonella enterica* Plasmid pSN254. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 61:1221–1228.
143. Goni-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. Applied and Environmental Microbiology 2000; 66:125–132.
144. Bergey DH, Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Ed. Baltimore: Editora Williams & Wilkins. 1994.
145. Oliveira A, Pampulha ME. Effects of Long-term Heavy Metal Contamination on Soil Microbial Characteristics. Journal of Bioscience and Bioengineering 2006; 102:157-161.

146. World Health Organization. Guidelines for the Programatic Management of Drug-Resistant Tuberculosis – Emergency Update. 2008.

147. Goldstein C, Margie DL, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2001; 45:723-726.

148. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell 2007; 128:1037-1050.

149. Oyetibo GO, Ilori MO, Adebusoye SA, Obayori OS, Amund OO. Bacteria with Dual Resistance to Elevated Concentrations of Heavy Metals and Antibiotics in Nigerian Contaminated Systems. Environmental Monitoring and Assessment 2010; 168:305-314.

150. Stock I, Burak S, Wiedemann B. Natural Antimicrobial Susceptibility Patterns and Biochemical Profiles of *Leclercia adecarboxylata* Strains. Clinical Microbiology and Infection 2004; 10:724-733.

151. Corti G, Mondanelli N, Losco M, Bartolini L, Fontanelli A, Paradisi F. Post-traumatic Infection of the Lower Limb Caused by Rare Enterobacteriaceae and Mucorales in a Young Healthy Male. International Journal of Infectious Diseases 2009; 13:e57-e60.

152. Walckenaer E, Poirel L, Leflon-Guibout PN, Nicolas-Chanoine MH. Genetic and Biochemical Characterization of the Chromosomal Class A β-Lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2004; 48:305-312.

153. Castanheira M, Deshpande LM, DiPersio JR, Kang J, Weinstein MP, Jones RN. First Descriptions of blaKPC in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Journal of Clinical Microbiology 2009; 47:4129–4130.

154. Narisawa N, Haruta S, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. Coexistence of Antibiotic-Producing and Antibiotic-Sensitive Bacteria in Biofilms Is Mediated by Resistant Bacteria. Applied and Environmental Microbiology 2008; 74:3887-3894.

155. Martinez JL. The Role of Natural Environments in the Evolution of Resistance Traits in Pathogenic Bacteria. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 2009; 276:2521-2530.

156. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the Wild: Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. Nature Reviews Microbiology 2010; 8:251-259.
157. Beveridge TJ, Hughes MN, Lee H, Leung KT, Poole RK, Savvaidis I, Silver S, Trevors JT. Metal-Microbe Interactions: Contemporary Approaches. In: Poole RK. (ed.), Advances in Microbial Physiology, USA: Academic Press, 38:178-243, 1997.
158. Levengood JM, Beasley VR. Principles of Ecotoxicology, In: Gupta RC. Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles, USA: Academic Press, p.689-708. 2007.
159. Silver S. Genes for All Metals – a Bacterial View of the Periodic Table. Journal of International Microbiology and Biotechnology 1998; 20:1–12.
160. McArthur JV, Tuckfield RC. Spatial Patterns in Antibiotic Resistance among Stream Bacteria, Effects of Industrial Pollution. Applied and Environmental Microbiology 2000, 66:3722– 3726.
161. Silveira APD, Freitas SS. Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Campinas: Instituto Agronômico. 2007.

**Anexo 1**

---

**Meios de cultura, Reagentes e Soluções.**

A. Caldo Nutriente (Difco)

Formulação (por litro):

Extrato de carne ..... 3,0 g

Peptona ..... 5,0 g

Preparo: Dissolver 8,0 g do meio de cultura em 1 L de água destilada. Em seguida, esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira até o momento do uso.

B. Ágar Nutriente (Difco)

Formulação (por litro):

Extrato de carne ..... 3,0 g

Peptona ..... 5,0 g

Agar ..... 15,0 g

Preparo: Dissolver 23,0 g do meio de cultura em 1 L de água destilada, utilizando banho-maria e agitação frequente. Em seguida, esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira até o momento do uso.

C. Solução Violeta de Genciana

Violeta de Genciana .....1,0 g

Ácido Fênico.....2,0 g

Álcool a 95° .....10 mL

Água Destilada .....100 mL

D. Solução de Lugol

Iodo .....1,0 g

Iodureto de Potássio .....2,0 g

Água Destilada .....300 mL

E. Solução de Fucsina

Fucsina Básica .....1,0 g

Fenol Fundido .....5,0 g

Álcool a 95° .....10 mL

Água Destilada .....100 mL

(Esta solução será diluída a 1/10 para ser usada na coloração de Gram)

F. Caldo Nutriente (Difco) com Glicerol (Sigma-Aldrich) a 20 %

Preparo: Dissolver 0,64 g do meio de cultura em 80 mL de água destilada. Adicionar 20 mL de Glicerol. Homogeneizar a mistura mantendo em agitação. Em seguida, esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira até o momento do uso.

G. Ágar-Estoque

Formulação (por litro):

Cloreto de Sódio.....8,0 g

Caldo Nutriente (Difco).....10,0 g

Ágar .....6,0 g

Preparo: Dissolver o meio de cultura, junto com o ágar e o cloreto de sódio em 1 L de água destilada, utilizando banho-maria e agitação frequente. Em seguida, esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira até o momento do uso.

H. Caldo Mueller-Hinton (Oxoid)

Formulação (por litro):

Infusão de carne ..... 300,0 g

Caseína Hidrolisada ..... 17,5 g

Amido .....1,5 g

Preparo: Dissolver 21,0 g do meio de cultura em 1 L de água destilada. Em seguida, esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira até o momento do uso.

I. Ágar Mueller-Hinton (Oxoid)

Formulação (por litro):

Infusão de carne ..... 300,0 g

Caseína Hidrolisada ..... 17,5 g

Amido .....1,5 g

Ágar .....17,0 g

Preparo: Dissolver 38,0 g do meio de cultura em 1 L de água destilada, utilizando banho-maria e agitação frequente. Em seguida, esterilizar em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Armazenar em geladeira até o momento do uso.

J. Tampão TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5X

Formulação (por litro):

TRIS (Sigma-Aldrich) ..... 54,0 g

EDTA (Sigma-Aldrich) ..... 4,7 g

Ácido Bórico (Sigma-Aldrich) .....27,5 g

Preparo: Dissolver os reagentes em 1 L de água bidestilada, utilizando agitação frequente. Para diluir esta solução concentrada 5X para a concentração de uso (0,5X) deve-se misturar 1 parte de TBE 5X (100 mL) e 9 partes de água bidestilada (900 mL). Armazenar em temperatura ambiente até o momento do uso.

L. Solução de Brometo de Etídeo (0,5 mg / mL)

Preparo: Pesar e adicionar cuidadosamente 0,5 g de Brometo de Etídeo (Sigma-Aldrich) a 1 L de água bidestilada, em um recipiente reservado exclusivamente para o armazenamento desta solução, que deve ser mantida ao abrigo da luz.

**Anexo 2**

---

**Técnica de Coloração de Gram.**

A. Preparação do esfregaço:

1. Depositar uma gota do crescimento bacteriano em Caldo Nutriente (Difco) sobre uma lâmina limpa e seca;
2. Espalhar o material foi sobre a lâmina, procurando obter um esfregaço fino;
3. Deixar a lâmina secar à temperatura ambiente;
4. Passar a lâmina de 2 a 3 vezes pela chama do bico de Bunsen para fixar o esfregaço;
5. Deixar a lâmina esfriar à temperatura ambiente.

B. Coloração das Células Bacterianas:

1. Cobrir o esfregaço com a solução Violeta de Genciana (Anexo 1) e aguardar durante 1 minuto;
2. Adicionada a solução de Lugol (Anexo 1) e esperar por mais 1 minuto;
3. Escorrer as duas soluções da lâmina por inclinação;
4. Gotejar 10 mL de álcool sobre o esfregaço;
5. Lavar a lâmina rapidamente com água;
6. Cobrir o esfregaço com Fucsina (Anexo 1) e aguardar durante 30 segundos;
7. Lavar a lâmina novamente com água e secar com papel de filtro.

C. Bacterioscopia:

Observar o esfregaço contido na lâmina ao microscópio óptico, utilizando a lente objetiva de imersão (100 X) e uma gota de óleo de cedro (Merck). Como resultado, as bactérias Gram-positivas são visualizadas coradas em roxo e as bactérias Gram-negativas coradas em vermelho.

**Anexo 3**

---

**Procedimentos Realizados para a Identificação das Bactérias Gram-negativas Resistentes ao Mercúrio.**

A. Procedimento técnicos para a utilização do BBL™ Crystal™ Enteric / Nonfermenter ID Kit:

1. Em condições assépticas, selecionar com auxílio de alça bacteriológica descartável uma colônia isolada grande ou 4 a 5 colônias pequenas a partir de uma placa contendo cultura pura em Ágar Sangue ou Ágar MacConkey com no máximo 24 horas;
2. Suspender as colônias no tubo de ensaio contendo o "Líquido de inóculo BBL Crystal Enteric / Stool";
3. Com o tubo bem fechado, agitar a suspensão bacteriana em vórtex durante 15 segundos;
4. Colocar a totalidade do conteúdo do líquido do inóculo na área alvo da base do sistema de identificação;
5. Segurar a base suavemente com as mãos e fazer o inóculo circular na trilha até que todos os poços fiquem cheios do liquído;
6. Alinhar a tampa com a base, de forma que a extremidade marcada da tampa fique por cima da área alvo da base;
7. Posicionar os polegares sobre as bordas da tampa e empurrar para baixo até a tampa se encaixar na base (dois cliques serão ouvidos);
8. Incubar os painéis virados para baixo em incubadora sem $CO_2$ e com umidade de 40 a 60 %, em temperatura entre 35 e 37 ºC, durante 18-24 horas;
9. Após o período de incubação, ler cada painel utilizando o "BBL Crystal Light Box" e anotar a pontuação atribuída a cada resultado de reação;
10. O perfil numérico resultante, que deverá ter 10 dígitos, deverá ser inserido no software "BBL Crystal ID System Electronic Codebook", para que a identificação do microrganismo seja concluída.

**Quadro 3 –** Substratos Enzimáticos e Bioquímicos Contidos no BBL™ Crystal™ Enteric / Nonfermenter ID Kit.

| Substrato Bioquímico | Resultado Positivo | Resultado Negativo | Princípio do Teste |
|---|---|---|---|
| 1 - Arabinose | Amarelo | Vermelho | Utilização de carboidratos resultando em diminuição do pH e alteração do indicador (Vermelho de fenol) |
| 2 - Manose | Amarelo | Vermelho | |
| 3 - Sacarose | Amarelo | Vermelho | |
| 4 - Melibiose | Amarelo | Vermelho | |
| 5 - Ramnose | Amarelo | Vermelho | |
| 6 - Sorbitol | Amarelo | Vermelho | |
| 7 - Manitol | Amarelo | Vermelho | |
| 8 - Adonitol | Amarelo | Vermelho | |
| 9 - Galactose | Amarelo | Vermelho | |
| 10 - Inositol | Amarelo | Vermelho | |
| 11 - p-n-p-fosfato | Amarelo | Incolor | Hidrólise enzimática do glicosídeo |
| 12 - p-n-p-α-β-glucosideo | Amarelo | Incolor | |
| 13 - p-n-p-β-galactosideo | Amarelo | Incolor | |
| 14- Prolina nitroanilido | Amarelo | Incolor | Hidrólise enzimática do amido |
| 15 - p-n-p-bis-fosfato | Amarelo | Incolor | Hidrólise enzimática do glicosídeo |
| 16 - p-n-p-xilosideo | Amarelo | Incolor | |
| 17 - p-n-p-α-arabinosideo | Amarelo | Incolor | |
| 18 - p-n-p-fosforilcolina | Amarelo | Incolor | |
| 19 - p-n-p-β-glucuronideo | Amarelo | Incolor | |
| 20 - p-n-p-N-acetil-glucosaminida | Amarelo | Incolor | |
| 21 - γ-L-glutamil-p-nitroanilido | Amarelo | Incolor | Hidrólise enzimática do amido |
| 22 - Esculina | Castanho | Palha | Hidrólise da esculina na presença de íon férrico |
| 23 - p-nitro-DL-fenilalanina | Laranja | Amarelo | Desaminação oxidativa da fenilalanina em presença de íon férrico |
| 24 – Uréia | Azul | Amarelo | Hidrólise da uréia com liberação de amônia, alterando a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol) |
| 25 - Glicina | Azul | Amarelo | Degradação da glicina, produzindo metabólitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol) |
| 26 - Citrato | Azul | Amarelo | Utilização do citrato, produzindo metabólitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol) |
| 27 - Ácido malônico | Azul | Amarelo | Utilização do malonato, produzindo metabólitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol) |

**Quadro 3 –** Substratos Enzimáticos e Bioquímicos Contidos no BBL™ Crystal™ Enteric / Nonfermenter ID Kit.

(continuação)

| Substrato Bioquímico | Resultado Positivo | Resultado Negativo | Princípio do Teste |
|---|---|---|---|
| 28 - Cloreto de tetrazólio trifenil | Vermelho | Incolor | Redução do tetrazólio |
| 29 - Arginina | Vermelho | Amarelo | Catabolismo anaeróbio resultando em aumento do pH e alteração da cor do indicador (Violeta de bromocresol) |
| 30 - Lisina | Vermelho | Amarelo | |

B. Procedimentos técnicos para a utilização do API® 20E (BioMérieux):

1. Juntar o fundo à tampa de uma caixa de incubação e distribuir cerca de 5 mL de água destilada estéril nos alvéolos;
2. Inserir a galeria na caixa de incubação;
3. Utilizar um tubo contendo 5 mL de soro fisiológico ou água destilada estéril;
4. Com uma pipeta, coletar uma única colônia bem isolada de uma placa contendo cultura recente (24 horas);
5. Fazer uma suspensão bacteriana homogeneizando cuidadosamente as bactérias;
6. Introduzir a suspensão bacteriana nos tubos da galeria utilizando a mesma pipeta;
7. Para os testes Citrato, Piruvato de Sódio e Gelatina, encher o tubo e a cúpula;
8. Para os outros testes, encher apenas os tubos;
9. Para os testes Arginina, Lisina, Ornitina, $H_2S$ e Uréia, criar uma anaerobiose enchendo a cúpula com óleo de parafina;
10. Fechar a caixa de incubação;
11. Incubar em estufa bacteriológica em temperatura entre 36 e 38 ºC, durante 18-24 horas;
12. Após a incubação, realizar a leitura dos resultados dos testes bioquímicos;
13. Se três ou mais testes forem positivos, anotar os resultados e em seguida revelar os testes que necessitam da adição de reagentes;
14. Para revelar o teste da ação da enzima Triptofano-desaminase, adicionar uma gota do reagente TDA. Uma cor castanha-avermelhada indica uma reação positiva;
15. Para revelar o teste da produção de Indol, adicionar uma gota do reagente JAMES. Uma cor rosa difundida por toda a cúpula indica uma reação positiva;

16. Para revelar o teste de produção de Acetoína, adicionar 1 gota dos reagentes VP1 e VP2. Esperar, no mínimo 10 minutos. Uma cor rosa ou vermelha indica uma reação positiva e uma fraca coloração rosa após 10 minutos indica resultado negativo;
17. O teste para a produção de Acetoína deve ser efetuado por último, para que os gases liberados pela reação não interfiram nos outros testes da galeria;
18. Com os resultados dos testes bioquímicos, obtém-se um perfil numérico composto por 7 algarismos que deve ser introduzido no software "apiweb™" para concluir a identificação dos isolados bacterianos.

**Quadro 4 –** Substratos Enzimáticos e Bioquímicos Contidos no API® 20E (BioMérieux).

| Substrato Bioquímico | Resultado Positivo | Resultado Negativo | Princípio do Teste |
|---|---|---|---|
| 1 - 2-nitrofenil-βD-galactopiranosideo | Amarelo | Incolor | Ação da enzima β-galactosidase |
| 2 - L-arginina | Vermelho | Amarelo | Ação da enzima arginina di-hidrolase |
| 3 - L-lisina | Vermelho | Amarelo | Ação da enzima lisina descarboxilase |
| 4 - L-ornitina | Vermelho | Amarelo | Ação da enzima ornitina descarboxilase |
| 5 - Citrato de sódio | Azul | Verde | Utilização do citrato |
| 6 - Tiossulfato de sódio | Negro | Incolor | Produção de $H_2S$ |
| 7 - Uréia | Vermelho | Amarelo | Ação da enzima urease |
| 8 - L-triptofano | Vermelho | Amarelo | Ação da enzima triptofano desaminase |
| 9 - L-triptofano | Rosa | Incolor | Produção de indol |
| 10 - Piruvato de sódio | Vermelho | Incolor | Produção de acetoína |
| 11 - Gelatina | Difusão do Pigmento | Não Difusão | Ação da enzima gelatinase |
| 12 - D-glicose | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da glicose |
| 13 - D-manitol | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da glicose |
| 14 - Inositol | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da glicose |
| 15 - D-sorbitol | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da glicose |
| 16 - L-ramnose | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da glicose |
| 17 - D-sacarose | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da glicose |
| 18 - D-melibiose | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da glicose |
| 19 - Amigdalina | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da amigdalina |
| 20 - L-arabinose | Amarelo | Azul | Fermentação / oxidação da arabinose |

**Anexo 4**

**Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos.**

A. Preparo da Suspensão Bacteriana:

1. Suspender colônias puras e isoladas em Caldo Mueller-Hinton (Oxoid, Estados Unidos), com o auxílio de uma alça bacteriológica;
2. Incubar os tubos em estufa a 37 °C por 2 a 6 horas;
3. Comparar, a cada 2 horas, a turvação da suspensão com a escala 0,5 de Mc Farland (BioMérieux, França), equivalente a 1,5 X $10^8$ células bacterianas / mL;
4. Realizar a semeadura quando a suspensão bacteriana alcançar a turvação pré-determinada.

B. Semeadura da Bactéria e Aplicação dos Discos Contendo os Antimicrobianos:

1. Semear a suspensão bacteriana em induto contínuo sobre a superfície da placa de Ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Estados Unidos) utilizando um swab estéril;
2. Depositar, sobre a superfície da placa semeada, os discos de papel de filtro impregnados com os antimicrobianos: Ampicilina (10 μg), Ácido Nalidíxico (30 μg), Gentamicina (10 μg), Estreptomicina (10 μg), Cloranfenicol (30 μg), Sulfametoxazol-Trimetoprim (25 μg), Tetraciclina (30 μg) e Canamicina (30 μg), todos fornecidos pela Oxoid (Estados Unidos), tendo o cuidado de aplicar quatro discos por placa, para evitar a sobreposição de halos, que dificultaria a leitura e a interpretação do teste;
3. Utilizar a cepa-padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 como amostra controle do experimento;
4. Incubar as placas em estufa bacteriológica a 37 ºC durante 18 horas.

C. Leitura e Interpretação dos Resultados:

1. Medir o tamanho da zona de inibição do crescimento bacteriano (em milímetros) para cada antibiótico testado;
2. Interpretar a medida do halo de inibição do crescimento bacteriano seguindo as orientações do manual CLSI: as amostras bacterianas são Sensíveis quando o antimicrobiano é capaz de inibir seu crescimento; são Resistentes quando crescem na presença da droga; e são Intermediárias quando sofrem alguma inibição de crescimento, expressa por um diâmetro do halo de inibição reduzido.

**Anexo 5**

---

**Purificação dos Produtos de PCR.**

A. Recuperação dos Fragmentos de DNA contidos no Gel de Agarose:

1. Retirar o fragmento de DNA do gel de agarose, utilizando um bisturi;
2. Introduzir a fatia em um microtubo de 1,5 mL e pesar em balança analítica;
3. Registrar o peso da fatia de gel, que deve apresentar no máximo 300 mg;
4. Adicionar 10 µL do Tampão de Captura (tipo 3) para cada 10 mg da fatia;
5. Agitar em vórtex e incubar a 60 °C durante 20 minutos;
6. Centrifugar a 10.000 g durante 30 segundos;
7. Transferir a mistura para a coluna acoplada a um tubo coletor;
8. Manter a coluna em repouso durante 1 minuto em temperatura ambiente e iniciar o processo de purificação do DNA imediatamente.

B. Purificação do DNA:

1. Lavar a coluna com 500 µL de Tampão de Lavagem (tipo 1);
2. Centrifugar a 10.000 g por 30 segundos;
3. Transferir a coluna para um novo tubo coletor;
4. Descartar o tubo coletor contendo a solução residual;
5. Adicionar 50 µL do Tampão de Eluição (tipo 6) na coluna;
6. Deixar em repouso à temperatura ambiente durante 1 minuto;
7. Centrifugar a coluna a 10.000 g durante 1 minuto;
8. Recuperar o DNA purificado no tubo coletor e armazenar a -20 ºC até o momento do uso.

**Anexo 6**

---

**Procedimentos Realizados para o Sequenciamento de DNA.**

A. Preparo da Mistura de Reação:

Misturar 115,0 µL de BigDye™ e 175 µL de Tampão de Sequenciamento 5X, ambos incluídos no kit "ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" (Applied Biosystems, Estados Unidos).

B. Montagem das placas de 96 poços:

1. Distribuir 2,5 µL de água deionizada estéril nos poços de uma placa de 96 poços;
2. Adicionar 4,0 µL da amostra de DNA purificado e, em seguida, 1,0 µL do iniciador A1 (3,2 pmoles / µL) em cada poço da placa;
3. Adicionar 2,5 µL da Mistura de Reação em cada poço da placa contendo DNA alvo e o iniciador.

C. Amplificação do DNA para a marcação fluorescente:

1. Introduzir a placa no termociclador "GeneAmp PCR System 9700" (Applied Biosystems, Estados Unidos) e usar a seguinte programação de amplificação: 40 ciclos de 94 ºC / 10 segundos, 50 ºC / 5 segundos, 60 ºC / 4 minutos;
2. Após a amplificação, as amostras devem ser precipitadas, para remover os ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) livres, que posteriormente podem interferir na leitura da sequência de DNA.

D. Precipitação do DNA marcado:

1. Centrifugar a placa retirada do termociclador a 10.000 g durante 30 segundos;
2. Adicionar 30 µL de isopropanol 75 % em cada poço da placa;
3. Agitar a placa em vortéx durante 10 segundos;
4. Manter a placa em repouso durante 15 minutos, ao abrigo da luz;
5. Centrifugar a placa a 1.000 g durante 45 minutos;
6. Descartar o sobrenadante, vertendo a placa sobre papel absorvente;
7. Adicionar 50 µL de etanol 75 % (Merck, Alemanha) em cada poço da placa;
8. Centrifugar a placa a 1.000 g durante 15 minutos;
9. Descartar o sobrenadante, vertendo a placa sobre papel absorvente;

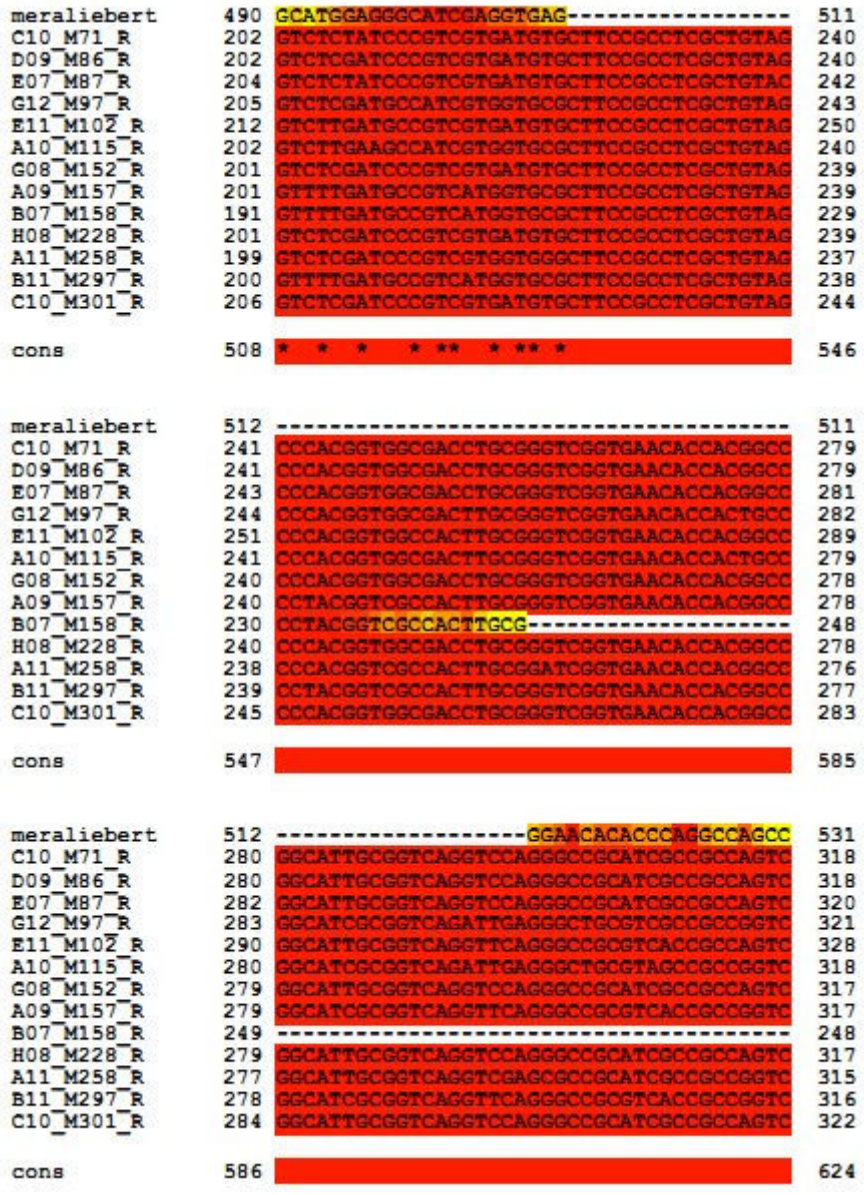
10. Dispor a placa na centrífuga em posição invertida (“spin down”), forrando a base do suporte para placas com papel absorvente;
11. Centrifugar a placa a 500 g durante 20 segundos;
12. Colocar a placa em um bloco aquecido a 60ºC, durante 10 minutos, ao abrigo da luz.

E. Sequenciamento do DNA:

1. Adicionar 10 µL da solução desnaturante Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems, Estados Unidos) em cada poço da placa;
2. Centrifugar a placa a 500 g durante 20 segundos;
3. Colocar a placa em um bloco aquecido a 95 ºC, durante 3 minutos, ao abrigo da luz;
4. Após o aquecimento, acondicionar a placa em um recipiente contendo gelo (4 ºC) e deixar de 5 a 10 minutos em repouso;
5. Centrifugar a placa a 500 g durante 20 segundos;
6. Introduzir a placa no sequenciador automático “48-Capilar ABI3730” (Applied Biosystems, Estados Unidos) para iniciar a eletroforese capilar.

**Anexo 7**

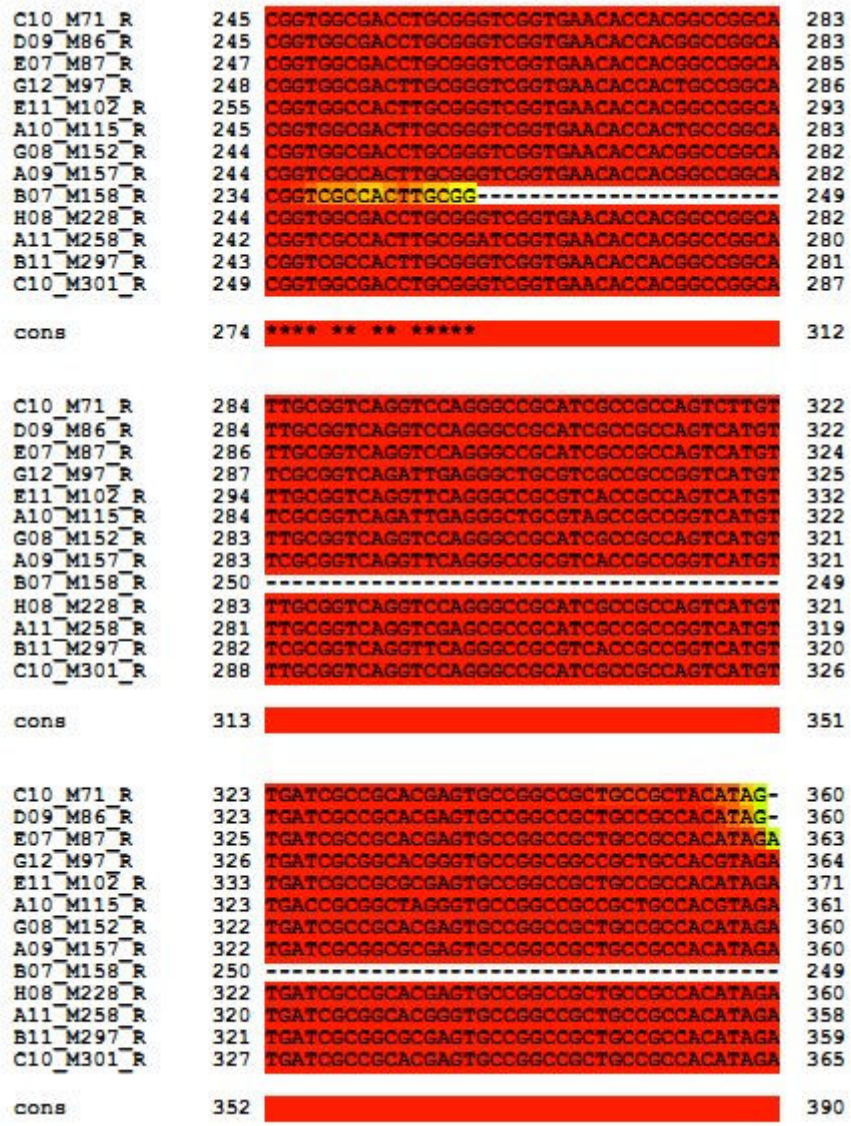
**Alinhamento Múltiplo Utilizando o Programa T-COFFEE para a Comparação das Sequências Genéticas Identificadas na Amostragem Bacteriana Estudada e o Fragmento do Gene *merA* Descrito por Liebert *et al.* [56].**




Legenda: 

## Anexo 8

**Alinhamento Múltiplo Utilizando o Programa T-COFFEE para a Comparação das Sequências Genéticas Identificadas na Amostragem Bacteriana Estudada.**




Legenda: . BAD AVG GOOD