

MICHELE DAS NEVES PINTO

**BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AO MERCÚRIO EM
BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará como Requisito Parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Dra. Ana Carolina Paulo Vicente.

BELÉM-PARÁ
2004

MICHELE DAS NEVES PINTO

**BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AO MERCÚRIO EM
BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará como Requisito Parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientadora: Dra. Ana Carolina Paulo Vicente.

BELÉM-PARÁ
2004

MICHELE DAS NEVES PINTO

**BASES MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AO MERCÚRIO EM
BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS DA AMAZÔNIA BRASILEIRA**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof^a. Dra. Ana Carolina Paulo Vicente.
Departamento de Genética, Fiocruz.

Prof^a. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro.
Departamento de Patologia, UFPA.

Prof^a. Dra. Maria Lúcia Harada.
Departamento de Genética, UFPA.

Prof^a. Dra. Antônia Benedita Rodrigues Vieira.
Departamento de Patologia, UFPA.

Prof^o. Dr. José Maria dos Santos Vieira.
Departamento de Farmácia, UFPA.

Belém, 02 de setembro de 2004.

"Um dia nosso planeta extinguir-se-á, como qualquer outro astro do universo, e nova forma de vida surgirá algures. São as leis da natureza cósmica e o ciclo da vida que o homem não pode interromper".

Rui Paes.

A Deus pela força e perseverança.

Aos meus pais Manoel e Suely que estiveram ao meu lado em
mais esta trajetória de minha vida, dedicando muito amor e
compreensão em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre me confortou nos momentos difíceis com suas infinitas graças. Muito obrigada por mais esta etapa de minha vida;

Aos meus pais, Manoel Pinto e Suely Canuto e à minha família por sempre me transmitirem o amor necessário a cada amanhecer;

À minha orientadora, Dra. Ana Carolina Paulo Vicente, chefe do Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos da FIOCRUZ/RJ, pela sua honrosa participação neste trabalho contribuindo com seu vasto conhecimento. Obrigada também pelo seu estímulo, seriedade e confiança com que conduziu o trabalho, além de se deslocar à Belém, para os dias de defesa;

À minha co-orientadora, Dra. Lena Líllian Canto de Sá, responsável pelo Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biologia Molecular da Seção do Meio Ambiente (SEMAM) /IEC, pela sua paciência, dedicação, interesse em sempre buscar os melhores resultados, através de seus conhecimentos, para a realização deste trabalho. Meus eternos agradecimentos também por sua amizade, confiança e perseverança durante a condução do estudo;

À Dra. Elisabeth de Oliveira Santos, chefe da Seção de Meio Ambiente do IEC, obrigada pelo seu apoio e oportunidade na realização da parte prática deste mestrado,

cedendo os Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biologia Molecular necessários para a concretização deste trabalho. Muito importante também foi sua contribuição com seus conhecimentos e experiência que envolvem o assunto, meu muito obrigada;

Ao Instituto Evandro Chagas, na pessoa do seu Diretor, Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro, pelo apoio institucional fundamental para a concretização do trabalho;

Ao Corpo Docente do Curso de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da UFPA, pela oportunidade de realização deste curso, possibilitando meu aprimoramento profissional. À Capes pela oportunidade de concessão da bolsa de estudo;

Ao Dr. Edilson da Silva Brabo, responsável pelo Laboratório de Toxicologia da Seção do Meio Ambiente/IEC, Dr. Marcelo de Oliveira Lima e Dr. Kleber Freitas Fayal da SEMAM/IEC obrigada por contribuírem com seus ensinamentos na hora das dúvidas;

Aos Professores, membros da banca examinadora desta dissertação de mestrado: Prof^a. Dra. Karla Tereza Ribeiro, Prof^a. Dra. Maria Lúcia Harada, Prof^a. Dra. Antônia Vieira e Prof^o. Dr. José Maria dos Santos Vieira por participarem do trabalho através de suas avaliações na banca examinadora no dia da defesa;

À Prof^a. Maria de Fátima Assis do Laboratório de Cultura de Tecidos da SEMAM/IEC por auxiliar na revisão bibliográfica textual;

Ao Elivam Rodrigues Vale, Ana Gabriela Carreira de Andrade, Márcia Brazão e Silva Brandão e Raimundo Pio Girard Martins, obrigada pela amizade, companheirismo e apoio nas horas necessárias;

Ao colega, Roberto Carlos Brandão do Setor de Geoprocessamento da SEMAM/IEC sempre atencioso no momento de edição do texto da dissertação, confecção do mapa da área de estudo e das figuras contidas no trabalho;

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia Ambiental da SEMAM/IEC, Sr. Luciano Gomes de Oliveira e Sra. Geralda, pelo auxílio técnico no desenvolvimento do trabalho; E do Setor de Esterilização da SEMAM/IEC, Sra. Maria de Nazaré Alves Fernandes e Sra. Ubaldina do Rosário, pelo auxílio na preparação e esterilização de meios de cultivo e vidrarias utilizados no decorrer do trabalho;

Ao bibliotecário Nilton César Mendes Pereira e Sra. Iracema que me ajudaram no levantamento bibliográfico e requisição de artigos;

À Dra. Karla Lima da Seção de Bacteriologia do IEC pelo auxílio na realização do teste com um dos iniciadores utilizados na PCR em termociclador com gradiente;

Aos colaboradores da SEMAM/IEC Iracina Maura de Jesus, Fábio Messias Soares dos Santos, Eliomar Norões Santiago, também contribuíram para o trabalho;

Aos demais colegas da Seção do Meio Ambiente do IEC e da UFPA pelo convívio durante o período de concretização desta dissertação. Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira participaram e permitiram que este estudo fosse desenvolvido.

Meu muito obrigada a todos vocês!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 MERCÚRIO (HG)	5
1.1.1 Ocorrência em Ambientes Naturais e Fontes Antropogênicas	7
1.1.2 Emissão nas Áreas com Atividade Garimpeira na Amazônia	8
1.1.3 Efeitos à Saúde Humana	10
1.1.4 Ciclo do Mercúrio	13
1.2 METILAÇÃO E DEMETILAÇÃO DO HG POR BACTÉRIAS	17
1.2.1 Resistência Bacteriana ao Hg	22
1.3. OBJETIVOS	30
1.3.1 Geral	30
1.3.2 Específicos	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 ÁREAS DE AMOSTRAGEM	31
2.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SUBSTRATO DE FUNDO DE RIO E DE IGARAPÉ	36
2.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS	36
2.4 Outras Bactérias Utilizadas neste	

	Estudo.....	38
2.5	DETERMINAÇÃO IN VITRO DA RESISTÊNCIA AO CLORETO DE METILMERCÚRIO E CLORETO DE MERCÚRIO POR ESPECTROFOTOMETRIA.	38
2.6	DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORETO DE METILMERCÚRIO E CLORETO DE MERCÚRIO EM PLACA.....	40
2.7	EXTRAÇÃO DO DNA.....	41
2.7.1	Extração de DNA Genômico.....	41
2.8	ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO OPERON <i>MER</i> DE RESISTÊNCIA AO Hg.....	42
2.9	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	44
2.10	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	46
2.11	Reação de Seqüenciamento Usando o Kit Big Dye Terminator da ABI.....	46
2.12	Análise Estatística.....	48
3	RESULTADOS	
4	DISCUSSÃO	
5	CONCLUSÕES	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1	Ciclo do Mercúrio..... 14
Figura 2	Mecanismo da transferência do grupamento metil da vitamina B12 ao mercúrio (DBI)..... 20
Figura 3	Descrição do operon <i>mer</i> e mecanismo de redução do Hg^{2+} à Hg^0 em bactérias de limitado espectro 25
Figura 4	Descrição do operon <i>mer</i> e mecanismo de redução do CH_3Hg^- à Hg^0 em bactérias de amplo espectro. 27
Figura 5	Localização da área de estudo..... 34
Figura 6	Fluxograma do isolamento das Bactérias..... 37
Figura 7	Fluxograma do teste de resistência ao MeHgCl em Caldo..... 39
Figura 8	Estratégias de PCR utilizadas para caracterização do operon <i>mer</i> 43
Figura 9	Resultado do PCR para o operon <i>mer</i> 52
Figura 10	Produtos obtidos da PCR alvo-específica em gel de agarose 1,5 % para os genes do operon <i>mer</i> do <i>Acinetobacter baumannii</i> Linha 1 - <i>merP1-A0</i> , linha 2 - marcador de peso molecular 1 kb, linha 3 - <i>merR2-T1</i> , linha 4 - <i>merP1-A0</i> , linha 5 - <i>merP1-A5</i> , linha 6 - <i>merP1-D1</i> , linha 7 - <i>merC1-A0</i> , linha 8 - <i>merA1-A5</i> , linha 9 - <i>merA6-D1</i> 53

Figura 11	Seqüência do operon <i>mer</i> do <i>Acinetobacter baumannii</i>	57
Tabela 1	Descrição dos pontos de amostragem em Barreiras-Pa, 2001.....	33
Tabela 2	Descrição dos pontos de amostragem em Caxiuanã-Pa, 2001.....	35
Tabela 3	Combinações utilizadas com os iniciadores para caracterização do operon.....	42
Tabela 4	Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR).....	45
Tabela 5	Número de cepas envolvidas no estudo.....	49
Tabela 6	MIC referente aos isolados bacterianos de Barreiras e Caxiuanã, Pará, 2002.....	50
Tabela 7	Análise da seqüência (<i>GenBank</i> AJ251307) do operon <i>mer</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
Cax.	Caxiuanã
DNA	ácido desoxirribonucléico
ECFP	Estação Científica Ferreira Penna
Hg	Mercúrio
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
M	Molar
MIC	concentração inibitória mínima
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	Próton
ppm	parte por milhão
PCR	reação em cadeia da polimerase
rpm	rotações por minuto
T	Toneladas
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TSA	<i>Trypitic Soy Agar</i>
TSB	<i>Trypitic Soy Broth</i>
U	Unidade
V	Volts

RESUMO

Mercúrio é um dos elementos mais tóxicos tanto para seres humanos como os demais animais. Em ambientes naturais seus compostos podem ter origem em fontes naturais ou em decorrência da ação do homem. A atividade microbiana tem papel crítico na biorremediação. A resistência ao mercúrio nas bactérias está associada a um conjunto de genes organizados no operon *mer*. Considerando este cenário realizamos um estudo com bactérias Gram-negativas isoladas de sedimento de rios de duas áreas com distintos graus de atividade antropogênica, Barreiras e Caxiuanã. A resistência ao mercúrio foi avaliada em ensaios de crescimento *in vitro* da bactéria em meio contendo Hg. A presença do operon *mer* foi determinada por PCR para os genes *RTPCABD*, componentes do operon. O ensaio *in vitro*, determinou que apenas 2 isolados dos 107 avaliados, *Acinetobacter baumannii* de Caxiuanã e *Pseudomonas stutzeri* de Barreiras, apresentavam resistência ao Hg. Um operon *mer* foi identificado e caracterizado apenas do isolado *Acinetobacter baumannii*. Este apresenta os genes *RTPCAD* e sua organização e seqüência nucleotídica possui identidade total com o operon *mer* de um isolado de *Acinetobacter calcoaceticus* da Rússia.

ABSTRACT

Mercury is one of the most toxic elements, for both human and animals. Its compounds in natural environments can arise from natural and anthropogenic sources. Microbial activities play a critical role in bioremediation. Mercury resistance in bacteria is associated with a gene cluster present on *mer* operon. Considering that picture we carried on a study with Gram-negative bacteria isolates from freshwater sediment from two areas with distinct anthropogenic impact, Barreiras and Caxiuanã. Resistance to Hg was evaluated by *in vitro* growing in medium containing Hg. The presence of *mer* operon was evaluated by PCR targeting *RTPCABD mer* gene sequences. The *in vitro* assay revealed that only two strains, from 107 isolates, were resistant to Hg the bacteria *Acinetobacter baumannii* from Caxiuanã and a *Pseudomonas stutzeri* from Barreiras. A *mer* operon was identified in the *Acinetobacter baumannii* strain and its sequencing revealed a organization as *merRTPCAD* and a complete nucleotide identity with a *mer* operon identified in a *Acinetobacter calcoaceticus* from Russia.

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros estudos acerca da resistência bacteriana aos metais pesados datam da década de 60. Um dos primeiros relatos foi feito por Moore (1960) e referiu-se a investigação de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes a sais de mercúrio (Hg) devido ao uso indiscriminado de compostos de mercúrio como desinfetantes e fungicidas em hospitais ou na comunidade ou ainda para esterilizar cateteres utilizados em procedimentos cirúrgicos.

Em relação às amostras ambientais, um dos primeiros trabalhos foi realizado também na mesma década por um grupo de pesquisadores do Japão. Bactérias foram isoladas do solo e testadas quanto a sua resistência para diferentes compostos organomercuriais (Cloreto de mercúrio, Acetato de fenilmercúrio e Fosfato de etilmercúrio) e em seguida identificadas bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Tonomura *et al.*, 1968).

Desde então, diversos trabalhos têm sido realizados envolvendo resistência a diferentes metais entre os mais distintos gêneros e espécies de bactérias. Estes mecanismos de resistência têm sido freqüentemente associados à presença de plasmídeos e transposons, podendo também ocorrer no cromossomo principal como por exemplo no

gênero *Bacillus* (Dias *et al.*, 1987; Ravina & Baath, 1996; Silver & Phung, 1996; Hobman *et al.*, 2002).

O processo de acumulação de metais em bactérias pode ocorrer de duas maneiras: por biossorção que é a adsorção do metal ao redor do envelope celular, sendo um processo independente do metabolismo; e por bioacumulação que ocorre por translocação ativa dos metais através do envelope celular. Este é um processo dependente do metabolismo bacteriano (Gomes *et al.*, 1998).

O aumento dos níveis de poluição ambiental por metais tóxicos associados a estas recentes descobertas vêm desencadeando um grande interesse nos processos de biorremediação dos mesmos no ambiente. Têm sido investigadas maneiras de tornar os ambientes ora contaminados em ambientes livres da contaminação por meio do uso de microrganismos capazes de metabolizar substâncias tóxicas presentes no ambiente, e transformá-las em uma forma cujo potencial de dano a saúde humana ou à fauna e flora seja reduzido (Chen & Wilson, 1997; Gomes *et al.*, 1998; Essa *et al.*, 2002; Döbler, 2003).

O mercúrio, além de ser um dos mais tóxicos dentre os metais, é também um dos mais usados na indústria, na agricultura e principalmente no garimpo. Com isso, uma

grande descarga deste metal e/ou de seus compostos chega ao meio ambiente submetendo as diferentes biotas, incluindo o homem, ao inevitável contato com este elemento (Moreira & Pivetta, 1997; Hylander & Meili, 2003).

A ocorrência de desastres ambientais envolvendo metais pesados tem sido relatada com uma certa frequência ao longo dos anos (Harada, 1995).

Os prejuízos para a fauna, flora e saúde humana têm sido computados ao longo dos anos, à medida em que avançam os conhecimentos sobre o risco potencial destas substâncias na cadeia alimentar (Santos *et al.*, 1995; Câmara *et al.*, 1996).

A utilização em grande escala do Hg na Amazônia data do período da intensa ocupação desta região na década de 70, por ocasião da instalação de diversas atividades antropogênicas que resultaram em contaminação ambiental por Hg e seus compostos, sobretudo a garimpagem do ouro. Este processo libera grande quantidade do metal para a atmosfera e para os ecossistemas aquáticos, ocasionando um desequilíbrio ambiental promovido pela incorporação lenta e gradual do Hg em diferentes compartimentos do ambiente (Brabo, 1992; Santos *et al.*, 2001).

Neste contexto, o envolvimento das bactérias nos processos de toxificação (metilação) e/ou detoxificação (demetilação) do Hg, tem sido descrita na literatura (Hamdy

& Noyes, 1975; Barkay *et al.*, 2003). O processo de metilação, por exemplo, disponibiliza para a cadeia alimentar a forma mais tóxica deste metal, sendo a responsável pelos efeitos produzidos à saúde humana nos casos de intoxicação. Em contrapartida, a demetilação bacteriana do Hg possibilita a remoção de sua forma mais tóxica (CH_3Hg^+) do ambiente, através da quebra da ligação entre o radical metil e o metal, retornando o mesmo para sua forma elementar (Hg^0) a qual não é tóxica (Miller, 1999).

O processo de biorremediação do Hg por bactérias mercúrio-resistentes em ecossistemas aquáticos, envolvendo distintos mecanismos, foi claramente demonstrado por diferentes grupos de pesquisadores (Gomes *et al.*, 1998; Essa *et al.*, 2002; Döbler, 2003). Dentre os principais mecanismos podemos destacar a formação de HgS insolúvel e a redução enzimática para Hg^0 através de sua volatilização.

Considerando a importante participação das bactérias no ciclo ambiental do Hg, a grande diversidade genética apresentada por estes organismos e a ausência de informações sobre estes processos em isolados bacterianos da Amazônia brasileira, vimos a necessidade de realizar estudos bioquímicos e genéticos sobre a resistência de bactérias ao Hg na região Amazônica.

1.1 MERCÚRIO

O Hg deriva da palavra grega *Hydrargyrum* que significa “água prateada”, por se apresentar como um elemento líquido prateado e brilhante à temperatura ambiente (Brito Filho, 1988). Pode existir em três estados de oxidação: Hg^0 (mercúrio metálico ou elementar), Hg^{+1} (mercuroso) e Hg^{2+} (mercúrico) (Clarkson et al., 1988).

O mercúrio elementar é o único sob a forma de metal líquido em seu estado natural, possui elevada tensão superficial, é inodoro e de coloração prateada. Suas principais propriedades físicas e químicas são: número atômico 80 p; peso atômico 200,59 u; densidade específica de 13,5939 a 20°C; ponto de fusão 38,87°C; ponto de ebulição 356,58°C; pressão de vapor 0,0018 Torr (Oga, 1996). Sua volatilidade aumenta com a elevação da temperatura ambiente, podendo chegar até oito vezes quando a temperatura se eleva de 25°C a 50°C (Larini, 1997). Esta é a forma menos reativa com sistemas biológicos quando se compara com as formas iônicas ou orgânicas.

Segundo Foster (1983, 1987) o íon mercúrico inibe a síntese de macromoléculas e atividade enzimática após se ligar fortemente aos grupos sulfídricos das proteínas de membrana da bactéria promovendo toxicidade ao microrganismo.

Os compostos organomercuriais possuem átomos de carbono ligados ao mercúrio (Hg), formando compostos do tipo R-Hg-X e R-Hg-R', onde R e R' são radicais alquilas, como por exemplo metil, etil e propil; e o X corresponde a uma variedade de ânions, como cloreto, acetato, cianeto, iodeto e fosfato (Oga, 1996).

Esses compostos podem ser divididos em duas categorias: (a) aqueles de caráter anfifílico, ou seja, compostos onde o Hg encontra-se ligado a um radical orgânico através de uma ligação covalente e a um ânion inorgânico através de uma ligação eletrovalente (R-Hg-X); (b) aqueles de caráter lipofílico, nos quais o Hg está ligado a dois radicais orgânicos através de ligações covalentes (R-Hg-R'). O primeiro grupo é apolar, praticamente insolúvel na água e extremamente volátil (ex.:cloreto de metilmercúrio). O segundo grupo é caracterizado pela sua solubilidade na água e em lipídios e sua persistência no sistema aquático (ex.:dimetilmercúrio) (Moore, 1984).

1.1.1 Ocorrência em Ambientes Naturais e Fontes Antropogênicas

Grande parte do mercúrio no ambiente em geral se origina de processos naturais principalmente de erupções vulcânicas (Galvão & Corey, 1987). Os depósitos de cinábrio (sulfeto de mercúrio vermelho) e metacinabarita (sulfeto de mercúrio preto), são abundantes na superfície terrestre de regiões onde existem vulcões. Nos lugares onde existem estas rochas o teor de mercúrio é bastante elevado (Belliveau & Trevorst, 1989; Figueiredo, 2000).

Às proximidades de fontes potencialmente poluidoras, o nível do mercúrio pode atingir 10 ppm ou mais; enquanto nas rochas o mercúrio se encontra, mais ou menos homogeneamente distribuído em relação à profundidade, no solo este metal atinge sua mais alta concentração no horizonte superior, compreendido entre 5 e 20 cm da superfície (Silva *et al.*, 1994). Esses níveis de concentração são mais altos em rochas próximas a atividade vulcânica recente como fossas marinhas ou áreas de *geisers* (fontes naturais de água fervente), e em veios minerais (faixas de rocha) ou em zonas de fratura com impregnações. Na Amazônia, o teor basal de Hg nos solos e sedimentos é inferior a 0,1 ppm (Silva *et al.*, 1994).

Na atmosfera o metal é naturalmente encontrado, porém, sua concentração depende muito de fatores externos que podem alterar os níveis de Hg passando de 0,005 ppm, considerados normais, para 0,200 ppm em áreas próximas de depósitos desse metal (Schvartsman, 1985). Conclui-se que, o mercúrio existente na natureza advém ou de processos naturais ou da poluição causada pela sua utilização nos ambientes de trabalho (Câmara & Corey, 1992).

Dentre as diversas atividades produtoras de rejeitos contendo Hg destacam-se as explorações minerais e refinarias, indústrias de cloro-soda, tintas, farmacêuticas, artigos dentários, aparelhos elétricos e práticas agrícolas. As indústrias utilizam 76 % do mercúrio comercial sendo que desta percentagem, 26 % vai para o meio ambiente (Ferreira & Appel, 1991).

1.1.2 Emissão nas Áreas com Atividade Garimpeira na Amazônia

A atividade garimpeira representa uma das principais fontes de emissão antropogênica de mercúrio para o meio ambiente na região Amazônica. Foi estimado para a década de 80 que nas principais áreas de garimpo tenham

sido lançados mais de 1000 t do poluente metálico (Silva, 1993).

As formas de emissão estão diretamente relacionadas aos métodos de extração de ouro. Nos garimpos de sequio (recuperação do ouro contido em rochas e solos) o mercúrio é emitido na forma de resíduos do processo de amalgamação, geralmente sendo lançados nas barragens de rejeitos. Nos garimpos de rios (de balsa ou de baixões) o resíduo é lançado diretamente nos rios. Nos casos citados, o mercúrio emitido corresponde a 25 % da perda total do mercúrio utilizado nos garimpos. A forma mais importante de emissão, responsável por pelo menos 70 % do mercúrio lançado nos garimpos, ocorre durante os procedimentos de queima do amálgama (Silva, 1993).

Além das emissões realizadas pelos garimpeiros, existe ainda uma terceira fonte de emissão representada pelas casas de compras de ouro nas cidades de áreas garimpeiras (Malm *et al.*, 1990). Um estudo realizado por Jesus *et al.* (2001) nas cidades de Santarém e Itaituba - PA sobre a contaminação mercurial em trabalhadores dos estabelecimentos de compra e venda de ouro nessas cidades, demonstrou que em ambas localidades os trabalhadores apresentaram níveis médios de Hg na urina maior do que o considerado normal estabelecido na legislação brasileira,

até 10 µg/L, sendo 50 µg/L o limite de tolerância biológica (LSMS, 1992).

1.1.3 Efeitos à Saúde Humana

Estudos sobre os efeitos à saúde humana da contaminação ambiental por mercúrio têm sido realizados na Amazônia, sobretudo em áreas garimpeiras do vale do rio Tapajós a fim de avaliar a relação dos problemas de mortalidade e morbidade causadas pela presença deste metal no ambiente (Santos *et al.*, 1995; 1999).

Câmara & Corey (1992) destacaram como riscos que poderiam estar associados à presença de vários efeitos adversos à saúde de garimpeiros, agentes físicos, químicos, mecânicos, biológicos, ergonômicos e psicossociais. Dentre os efeitos mais importantes destaca-se a intoxicação por Hg.

Dados referidos na literatura mostram pelo menos duas vias principais que podem representar risco de intoxicação: a ingestão de alimentos contendo compostos organomercuriais, principalmente metilmercúrio, e a inalação de vapores de mercúrio elementar (Hg⁰) (Galvão & Corey, 1987).

A sintomatologia inicial da intoxicação por mercúrio caracteriza-se por sabor metálico na boca, cólica abdominal, náuseas, vômitos e diarreia, progredindo para um

quadro de corrosão da mucosa intestinal, irritação do trato respiratório, hemorragia gastrointestinal e edema pulmonar (Larini, 1987; Câmara & Corey, 1992).

As manifestações agudas ocasionadas pelos vapores de mercúrio (Hg^0) afetam principalmente os pulmões, causando bronquites e bronquiolites erosivas originando um quadro de edema pulmonar agudo, podendo levar o paciente ao óbito por insuficiência respiratória. Nesses casos, também se observam sintomas relacionados ao sistema nervoso central como excitabilidade e tremor. (Ferreira *et al.*, 2001).

As manifestações crônicas têm sintomatologia mais relacionada ao sistema nervoso central sendo observado entre outras, insônia, timidez e nervosismo. Exposições mais prolongadas produzem comumente perda de memória, insônia, perda do autocontrole, irritabilidade e excitabilidade, ansiedade, sonolência, podendo inclusive chegar a um quadro de depressão. O conjunto dessas manifestações recebe o nome de eretismo. Os casos graves podem apresentar alucinações, melancolias suicidas e psicose maniaco-depressiva (Galvão & Corey, 1987).

Cerca de 80 % dos vapores de mercúrio emitidos por ocasião da amalgamação e queima do ouro são rapidamente absorvidos e difundidos através das barreiras

hematoencefálica, placentária e podendo causar intoxicação aguda, sub-aguda e crônica (Galvão & Corey, 1987).

Em relação à ingestão de alimentos contaminados com organomercuriais, alguns acidentes de proporções consideráveis têm sido referidos na literatura (Harada, 1995; Eto, 2000). Um dos exemplos refere-se ao ocorrido na região de Minamata, em Kunamoto, no Japão, entre 1953 e 1956, onde os despejos de metilmercúrio da fábrica Chisso utilizado na produção de PVC, eram descartados num canal com conexão com a baía de Minamata de onde eram extraídos peixes e mariscos para o consumo, fato que deu origem à doença de Minamata (Harada, 1995).

Um segundo surto da doença de Minamata ocorreu em Niigata, no Japão, entre 1964 e 1965, em que 690 casos foram identificados dos quais 338 pacientes morreram (Takizawa, 1970). Até novembro de 1999, 2263 casos da doença foram identificados em Kunamoto e Kagashima no Japão, entre estes, 1368 morreram (Eto, 2000). Acidentes como este ocorreram também no Iraque, em 1956 e 1960 e na Suécia, em 1960 (Bakir *et al.*, 1973).

No Brasil, 110 trabalhadores da unidade eletrolítica de uma indústria de cloro-soda em São Paulo foram contaminados apresentando teores altos (2,113 ppm) de Hg na urina, sendo que o valor máximo aceitável pela OMS de Hg na urina é de 0,050 ppm. Outra indústria, também daquele

estado, de fabricação de lâmpadas, teve seus trabalhadores contaminados. (Câmara & Corey, 1992).

1.1.4 Ciclo do Mercúrio

Os ciclos biogeoquímicos descrevem a conversão e movimentação de elementos químicos por reações bioquímicas na biosfera. O mercúrio, na maioria dos ambientes naturais, ocorre em concentrações extremamente baixas. Entretanto, o fato de ser um metal amplamente utilizado na indústria, propicia sua disseminação no meio ambiente, a qual, em algumas situações, ocorre de maneira indiscriminada como a garimpagem do ouro e na queima de combustíveis fósseis, que lançam cerca de 50.000 toneladas/ano de Hg no ambiente (Mandigan, 1997).

As principais formas químicas envolvidas no ciclo do mercúrio são: mercúrio elementar (Hg^0), que tem pouca solubilidade na água e alta pressão de vapor; mercúrio inorgânico divalente (Hg^{++}), com fácil ligação a radicais orgânicos e inorgânicos, principalmente aqueles ricos em enxofre, e o metilmercúrio (CH_3Hg), que é altamente solúvel na água, resiste à degradação do ambiente sendo concentrado e distribuído nos tecidos biológicos (Lacerda, 1989).

Dois ciclos são responsáveis pela dispersão do mercúrio no ambiente: o ciclo global que envolve a

circulação atmosférica dos vapores de mercúrio vindos de fontes naturais ou antropogênicas, responsável pela distribuição global do referido metal; e o ciclo local, de abrangência mais restrita, que promove a quebra do equilíbrio natural em função da ocorrência de fontes antropogênicas, localizadas ou pontuais, de contaminação ambiental por mercúrio (Eysink *et al.*, 1988).

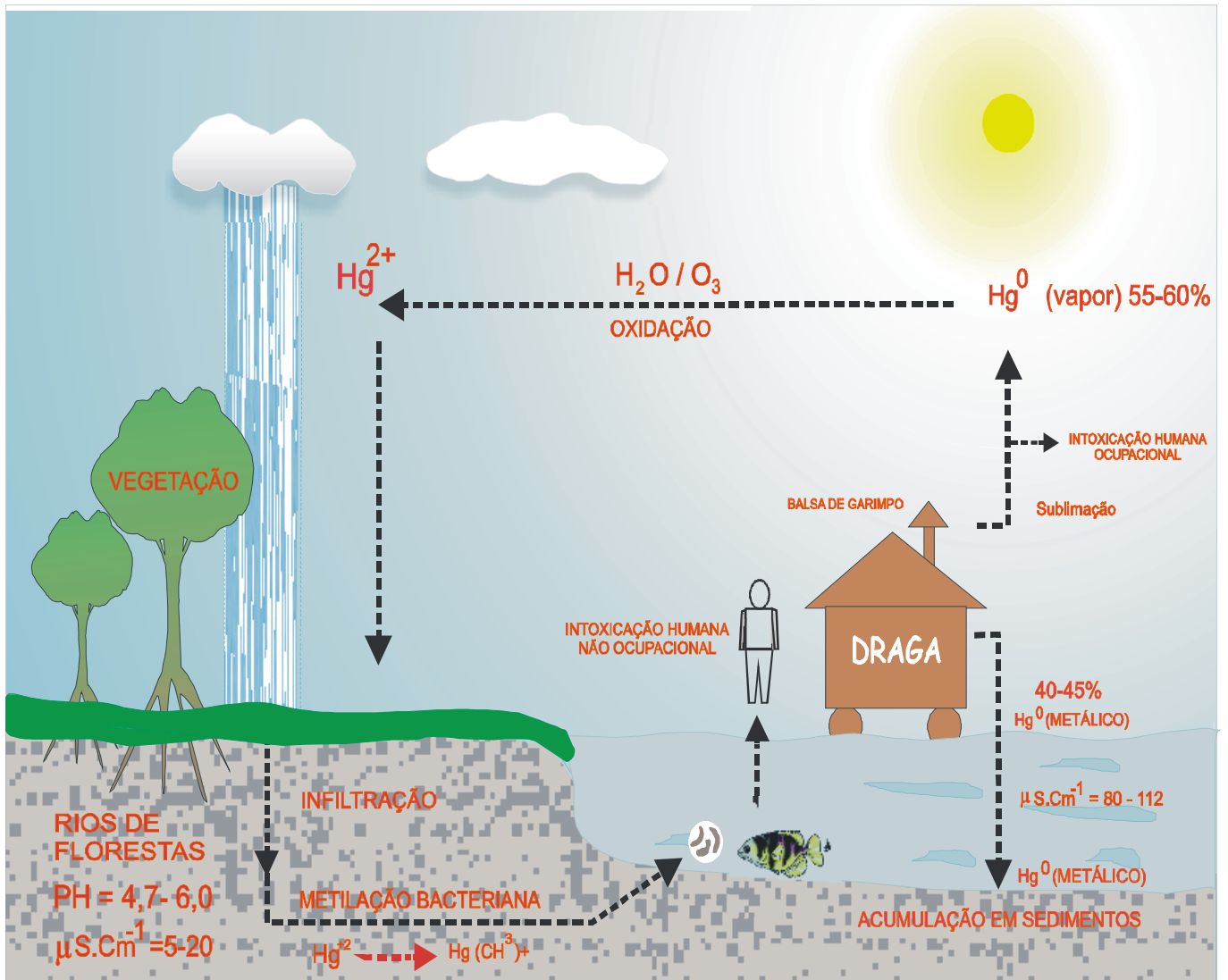


Figura 1 - Ciclo do mercúrio

Fonte: Geomática/ SEMAM/ IEC, 2002.

Na atmosfera, como representado na figura 1, por ocasião das erosões na superfície da terra, o mercúrio é transportado para a água superficial e para a circulação atmosférica através de desgaseificação natural da crosta terrestre, dos oceanos e da atividade vulcânica. O resultado desta emissão representa o achado de mercúrio nos diferentes compartimentos ambientais (Padberg, 1994). O tempo de permanência do mercúrio na atmosfera é estimado entre 6 e 90 dias. No solo o metal pode ficar 1000 anos, no oceano em torno de 2000 anos e milhões de anos no sedimento (Silva *et al.*, 1994).

No ciclo do mercúrio, ocorre um equilíbrio dinâmico entre as formas Hg^{2+} e Hg^0 . A principal forma de Hg na atmosfera é a elementar (Hg^0), a qual é volátil e pode ser oxidada a mercúrio iônico (Hg^{2+}) fotoquimicamente. A maior parcela do mercúrio introduzido no ambiente aquático está na forma de Hg^{2+} , o qual é rapidamente adsorvido ao material particulado dos rios e em seguida, metabolizado pelos microrganismos (Mandigan, 1997).

No ambiente aquático, a forma Hg^{2+} pode ser oxidada na presença de oxigênio sendo revertida à forma elementar (Hg^0) ou transformada em compostos organomercuriais (metilmercúrio (CH_3Hg) e dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), especialmente em ambientes ácidos. Neste último

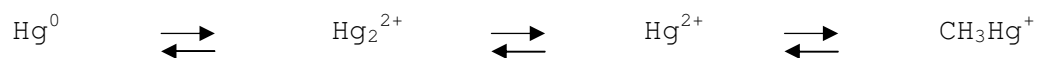
caso, a principal reação observada é a metilação do Hg, originando o metilmercúrio (CH_3Hg^+) (Trevors, 1986).

O metilmercúrio é solúvel em água e pode ser concentrado na cadeia alimentar aquática, passando pelo fitoplâncton e zooplâncton, microcrustáceos, crustáceos, peixes e finalmente atingindo o homem pela ingestão de alguns desses alimentos, ou pode, mais adiante, ser novamente metilado por microrganismos resultando em dimetilmercúrio ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$). Metabolicamente, a metilação do Hg ocorre através da doação de grupos metil da metilcobalamina ($\text{CH}_3\text{-B}_{12}$). Ambos, metilmercúrio e dimetilmercúrio, ligam-se a proteínas e tendem a acumular-se em tecidos animais, especialmente nos músculos (Silva et al., 1994; Mandigan et al., 1997).

1.2 METILAÇÃO E DEMETILAÇÃO DO Hg POR BACTÉRIAS

Pesquisas acerca da participação da biota aquática nos processos de metilação e demetilação do Hg no ambiente têm sido realizadas. Entretanto, para melhorar entendimento das transformações sofridas pelo Hg na natureza, mais detalhes sobre estes eventos precisam ser esclarecidos.

A biometilação do mercúrio inorgânico pode ocorrer segundo as transformações químicas e bioquímicas abaixo demonstradas:



Pelo menos três vias envolvendo a metilação de íons de mercúrio têm sido descritas: (1) metilação fotoquímica, um processo abiótico envolvendo a conversão do cloreto mercúrico a metilmercúrio por radiação ultravioleta utilizando como doadores do grupo metil os ácidos acético ou propiônico, metanol e etanol; (2) metilação mediada por bactérias, via metilcobalamina (vitamina b_{12}), a qual atua como grupo metil doadora para íons de mercúrio; (3) metilação bacteriana nas brânquias ou intestinos dos animais aquáticos, talvez também utilizando a metilcobalamina como grupo metil doador, sendo que esta última não tem sido testada (Trevors, 1986; Belliveau & Trevors, 1989).

A metilação biológica do mercúrio foi experimentalmente demonstrada em bactérias aeróbicas e anaeróbicas. A transferência dos grupos metil ao íon mercúrico acredita-se ocorrer por ataque eletrofílico do Hg^{2+} sobre a metilcobalamina, mais especificamente na

ligação C-Co, como ilustrado na figura 2 (Belliveau & Trevorst, 1989).

No ciclo do mercúrio no ambiente, as bactérias parecem atuar principalmente no material sedimentado, onde o Hg encontra-se na forma Hg^{2+} em equilíbrio com a forma Hg^{1+} . A forma Hg^{2+} sofre ação bacteriana sendo convertido em: mercúrio elementar (Hg^0) que permanece no sedimento, juntamente com a forma HgS mais freqüente neste compartimento ambiental redutor; dimetilmercúrio ($(CH_3)_2Hg$), que sai do sedimento para outros ecossistemas é convertido em metano, etano e mercúrio metálico (Hg^0); e metilmercúrio (CH_3Hg) que é muito tóxico e se acumula na cadeia alimentar (Belliveau & Trevorst, 1989; Barkay et al., 2003).

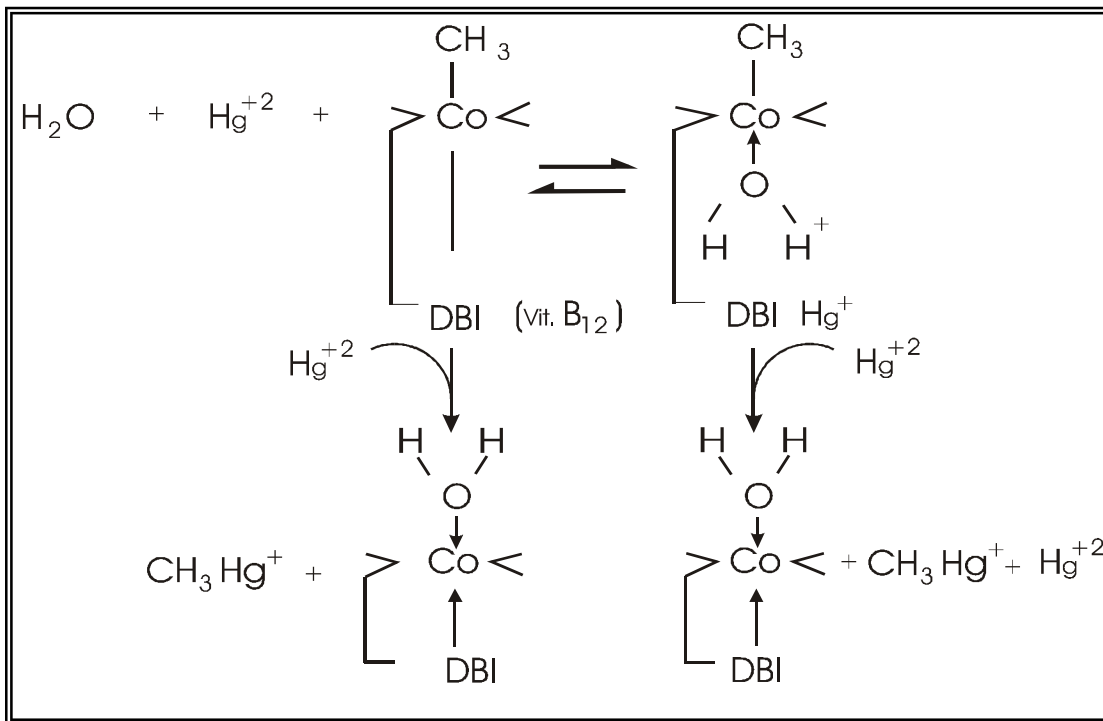


Figura 2 - Mecanismo da transferência do grupamento metil da vitamina B₁₂ ao mercúrio (DBI=5,6 dimetil-benzil-imidazol)

Fonte: Larini,1997.

Dependendo da composição química da matéria orgânica, do pH e nível de salinidade, o metilmercúrio pode concentrar-se no sedimento ou ser liberado para água. Quando elevados teores de enxofre estão presentes, a tendência é ficar retido no sedimento. Caso contrário, ocorre a sua liberação para água sob a forma de cátion

metilmercúrio (CH_3Hg^+), o qual, é facilmente assimilado pela fauna aquática (Essa *et al.*, 2002).

Acerca da demetilação de organomercuriais, esta pode ser realizada com ou sem a intervenção da biota. Alguns estudos indicam que os processos de metilação e demetilação ocorrem simultaneamente e tendem a atingir um equilíbrio dinâmico. O mecanismo proposto para a degradação do metilmercúrio, por exemplo, é uma reação de demetilação redutiva formando mercúrio inorgânico e metano. Este processo biológico envolve a quebra da ligação carbono-mercúrio pela enzima intracelular liase-organomercurial, seguida pela redução do Hg^{2+} pela mercúrio-redutase. O Hg^0 , menos tóxico, é liberado no citoplasma bacteriano, em seguida, difundido para fora da célula (Silver & Phung, 1996; Barkay *et al.*, 2003). É provável que o mercúrio elementar passe facilmente através da membrana celular por difusão devido a sua lipossolubilidade e alta pressão de vapor (Belliveau & Trevorst, 1989; Barkay *et al.*, 2003).

1.2.1 Resistência Bacteriana ao Hg

No ambiente, as sucessivas transformações sofridas pelo Hg, geram formas inorgânicas e orgânicas, como por exemplo o Hg^{2+} e o CH_3Hg^+ , que representam riscos não só para organismos superiores, mas também para os microrganismos.

A resistência ao Hg em bactérias tem sido intensamente pesquisada, de modo que, duas classes destes mecanismos mediados por enzimas foram descritas: a resistência de limitado-espectro e a resistência de amplo-espectro. A resistência de limitado-espectro, envolve a redução de Hg^{2+} a Hg^0 e é permissiva a alguns organomercuriais incluindo merbromina e acetato mercúrico de fluoresceína. Já o sistema de amplo-espectro é permissivo a todos os compostos acima referidos, incluindo a transformação redutiva (envolvendo hidrólise e detoxificação) de outros organomercuriais, entre eles o acetato de fenilmercúrio e o metilmercúrio (Silver & Phung, 1996).

As bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas resistentes ao Hg podem carrear os genes de resistência (operon *mer*) tanto em plasmídeos, transposons quanto no cromossomo, e o mecanismo de resistência é semelhante para esses grupos (Trevors, 1986).

Os mecanismos de resistência ao Hg têm sido intensamente estudados tanto quimica quanto molecularmente tendo como base do estudo operons *mer* que codificam resistência a este metal (Hobman *et al.*, 2002).

O gene que tem a função de regular o operon, reprimindo ou ativando a região promotora/operadora, é o gene *merR*, como ilustrado resumidamente na figura 3. Os demais são genes estruturais *merT*, *merP*, *merA*. Em alguns operons *mer* é encontrado também o gene *merD*, que parece reprimir a expressão do operon (Belliveau & Trevorst, 1989; Miller, 1999). Um outro gene que eventualmente tem sido encontrado é o *merE*. Tem sido sugerido que o mesmo também funcione no transporte do Hg para dentro do citoplasma da célula (Brown *et al.*, 2002).

O *merR* é o gene que codifica proteína citoplasmática que controla a transcrição dos genes estruturais *merTP(C)AD* positivamente ou negativamente. Seu produto identificado após a clonagem em um vetor de expressão mostrou ser um dímero de 15,9 kDa com cerca de 144 resíduos de aminoácidos (Belliveau & Trevorst, 1989; Miller, 1999; Brown *et al.*, 2002).

O gene *merT* codifica um polipeptídeo hidrofóbico de aproximadamente 12,4 kDa contendo 116 resíduos de aminoácidos. Suas propriedades físicas sugerem que ele seja

uma proteína de membrana a qual é consistente com sua função de transportar Hg^{2+} da membrana interna da célula para o citoplasma da bactéria como mostra a figura 3 (Foster, 1987; Miller, 1999; Brown et al., 2002).

Um outro gene envolvido no transporte do mercúrio do periplasma para a membrana interna da célula bacteriana é o *merP*, como mostrado na figura 3. MerP é uma proteína que provavelmente localiza-se no espaço periplasmático e tem tamanho aproximado de 9,4 kDa com cerca de 91 resíduos de aminoácidos (Belliveau & Trevorst, 1989; Miller, 1999; Brown et al., 2002).



Figura 3 - Descrição do operon *mer* e mecanismo de redução do Hg^{2+} à Hg^0 em bactérias de limitado espectro.

Fonte: Adaptado Mandigan, 1997 por Geomática/ SEMAM/ IEC.

O produto do gene *merC* parece estar associado com a membrana externa e no transporte do Hg. Estima-se que o mesmo seja constituído de 140 resíduos de aminoácidos no tamanho de 14 kDa (Belliveau & Trevorst, 1989; Miller, 1999).

O gene *merA* codifica a enzima conhecida como mercúrio redutase responsável pela conversão do Hg^{2+} a Hg^0 . Esta proteína encontra-se no citoplasma, embora esteja associada com a face interna da membrana citoplasmática (figura 3) (Belliveau & Trevorst, 1989; Miller, 1999).

A proteína codificada pelo gene *merD* é constituída de 13 kDa com 121 resíduos de aminoácidos (Silver & Walderhaug, 1992).

Os genes acima referidos, *merT*, *merP*, *merC*, *merA* e *merD* estão, primariamente, envolvidos na resistência de limitado-espectro. Para as bactérias que apresentam resistência de amplo-espectro, o operon *mer* é acrescido com um sexto gene chamado *merB* que codifica a enzima liase-organomercurial, uma proteína citoplasmática que promove a quebra da ligação carbono-mercúrio dos compostos organomercuriais, como mostrado na figura 4. Deste modo, nas bactérias que possuem resistência ao Hg de amplo-espectro, o mecanismo de resistência envolve a participação direta tanto do produto do gene *merA*, quanto do *merB* (Barkay, 1985).

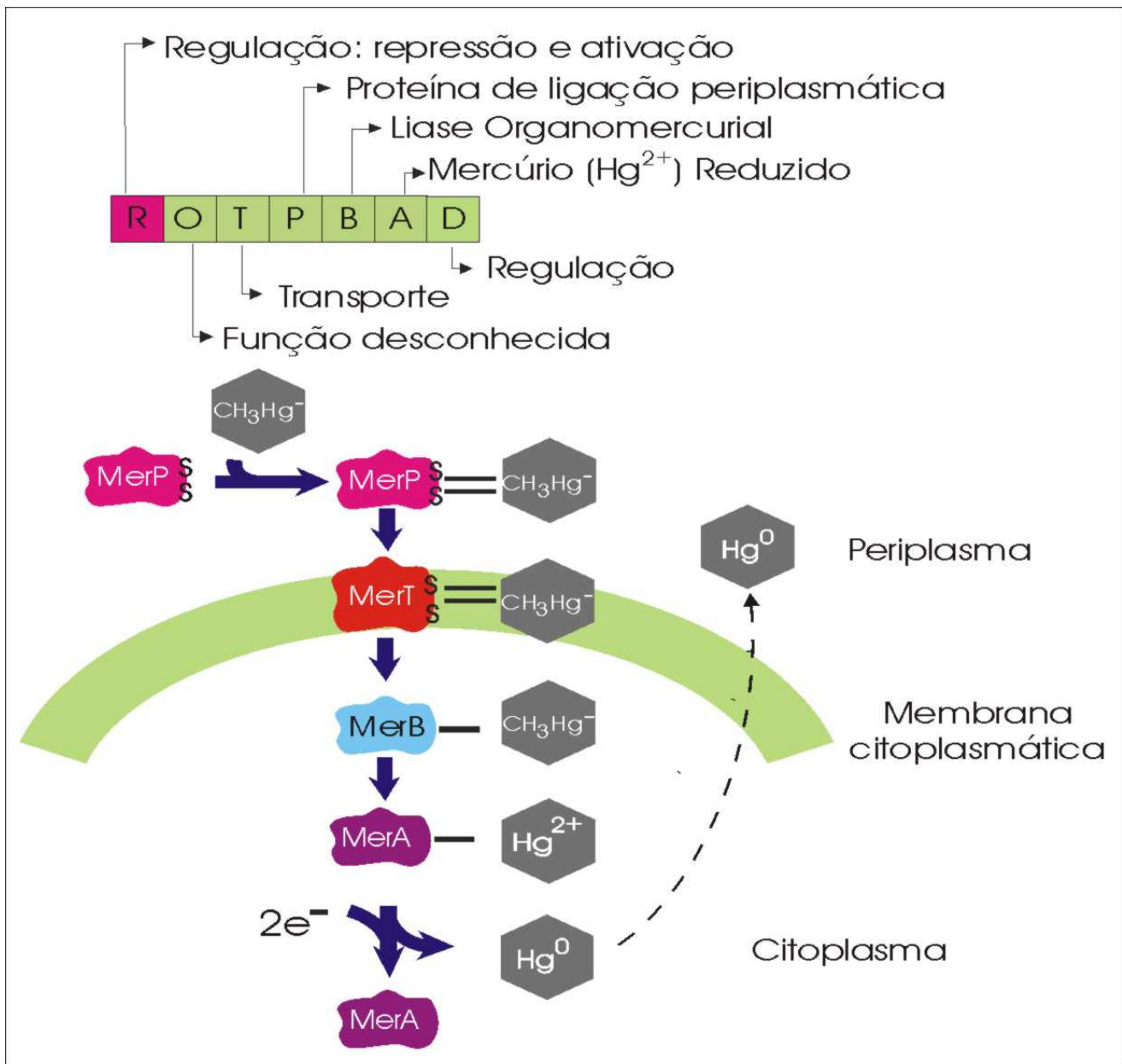


Figura 4 - Descrição do operon *mer* e mecanismo de redução do CH_3Hg^- à Hg^0 em bactérias de amplo espectro.

Fonte: Adaptado Mandigan, 1997 por Geomática/ SEMAM/ IEC.

O mecanismo de resistência de amplo-espectro ao Hg se dá quando da entrada do íon mercúrico (Hg^{2+}) no espaço periplasmático e sua ligação a MerP, liberando dois prótons. Esta ligação impede que o íon afete grupos sulfidrilas de proteínas no espaço periplasmático e na superfície da membrana citoplasmática (Belliveau & Trevorst, 1989; Miller, 1999). Em seguida, o íon Hg^{2+} é transferido da proteína MerP no periplasma para o MerT já na membrana interna, via um mecanismo de troca reduzida (oxiredução). Todas as transferências subseqüentes parecem se dar por este mecanismo (Belliveau & Trevorst, 1989; Miller, 1999).

A partir da membrana interna o íon Hg^{2+} é transferido para o citoplasma onde é reduzido a Hg^0 pelo produto do gene *merA* através de uma reação dependente de NADPH. Nesta forma é liberado no citoplasma e sai da célula por simples difusão devido sua solubilidade lipídica e sua alta pressão de vapor (Ghosh, *et al.*, 1996).

Em relação aos compostos organomercuriais (CH_3Hg , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$) seu transporte da superfície celular até o citoplasma ocorre através do mesmo mecanismo já descrito anteriormente para o Hg^{2+} . Uma vez no citoplasma, o composto organomercurial é transferido ao produto gene *merB* que quebra a ligação carbono-mercúrio e o reduz a Hg^{2+} que é novamente reduzido pelo produto do gene *merA* (mercúrio

reduzase) à sua forma elementar (Hg^0) e liberado para fora da célula (Smith *et al.*, 1998).

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Geral

Determinar a presença do operon *mer* em bactérias Gram-negativas isoladas da Amazônia Brasileira e caracterizar geneticamente este operon.

1.3.2. Específicos

Determinar os níveis de resistência ao mercúrio em cinco diferentes concentrações;

Avaliar a diferença entre os níveis de resistência encontrados entre as bactérias isoladas de área impactada e não impactada na Amazônia brasileira;

Detectar a ocorrência dos genes que compõem o operon *mer*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREAS DE AMOSTRAGEM

Foram selecionadas duas áreas para o isolamento das bactérias Gram-negativas: área impactada por Hg de fonte antropogênica e área controle, sem registro de contribuição mercurial de origem antrópica.

A área impactada selecionada para o estudo foi Barreiras, pertencente ao município de Itaituba, no Estado do Pará (figura 5). Encontra-se situada à margem esquerda do rio Tapajós (S 040.05.459' W 550 41.179') no limite com o município de Aveiro. É ligada à cidade de Itaituba por via fluvial, através do rio Tapajós e por via terrestre por estrada municipal numa extensão de 70 km. A população residente é de cerca de 1000 habitantes, distribuídas em 250 edificações, construídas ao longo de três ruas e quatro travessas. Nesta localidade foram estabelecidos 15 pontos de coleta, os quais encontram-se descritos na tabela 1.

A área controle selecionada foi a Estação Científica Ferreira Penna (ECCFP), e tem como coordenadas 01°42'30" de latitude Sul e 51° 31'45" de longitude Oeste, tendo como limite norte o divisor de águas entre as bacias do rio Caxiuanã e do rio Amazonas; ao sul o rio Caxiuanã; a leste a baía de Caxiuanã e o igarapé Laranjal e a oeste o igarapé Grande. Está localizada no interior dos 330 mil hectares da Floresta Nacional de Caxiuanã, município de

Melgaço, distando 400 Km em linha reta da capital do Estado do Pará, Belém (figura 5). A ECFP abrange uma área de 33 mil hectares da Floresta Nacional, da qual 80 % correspondem à floresta de terra firme e 20 % à floresta de várzea e igapó, além de uma abundante vegetação aquática. Esta é uma região que apresenta uma baixa densidade demográfica onde residem 220 pessoas, distribuídas em 4 localidades designadas: Pedreira - fora da estação, com 8 residências e 10 famílias; Laranjal - fora da estação, com 7 residências e 7 famílias; Caxiuanã - estação propriamente dita, com 9 residências e 13 famílias e Ibama - fora da estação, com 4 residências e 4 famílias. As localidades referidas como fora da estação encontram-se dentro da Flona de Caxiuanã (Lisboa, 1997).

TABELA 1 - Descrição dos pontos de amostragem em Barreiras-PA, 2000.

Nº do ponto de coleta	Barreiras	Coordenadas
	Ponto de amostragem	S W
B2	Boca do lago do enxofre	S 03° 59.501' W 055° 37.595'
B3	Dentro do Lago do Enxofre	S 03° 59.265' W 055° 37.941'
B4	Amostra coletada em frente a igreja da Fazenda Boca do Curí	S 03° 59.791' W 055° 37.781'
B5	Dentro do Lago do Curí	S 04° 01.701' W 055° 40.421'
B6	Rio Tapajós (margem direita) na direção do Tabuleiro Monte Cristo (IBAMA)	S 04° 04.730' W 055° 38.088'
B7	Lago Sta Clara (margem direita do Rio Tapajós)	S 04° 05.300' W 055° 38.197'
B8	Lago Sta Clara (margem direita do Rio Tapajós)	S 04° 06.138' W 055° 39.512'
B9	Lago Sta Clara	S 04° 06.062' W 055° 39.323'
B10	Lago Sta Clara	S 04° 05.414' W 055° 39.760'
B11	Ponta da Ilha em frente a barreiras, como localizado no esquema	S 04° 06.610' W 055° 40.382'
B12	Igarapé São Pedro (antes da ponte, em frente a Fazenda Itaquara)	S 04° 06.478' W 055° 40.237'
B13	Entrada do Igarapé São Pedro na confluência com o rio Tapajós	S 04° 05.040' W 055° 40.776'
B14	Barreiras (margem esquerda do Rio Tapajós)	S 04° 05.61' W 055° 41.771'
B15	Barreiras (margem esquerda do Rio Tapajós)	S 04° 06.758' W 055° 43.573'
B16	Ilha do Camaleão	S 04° 06.447' W 055° 42.684'

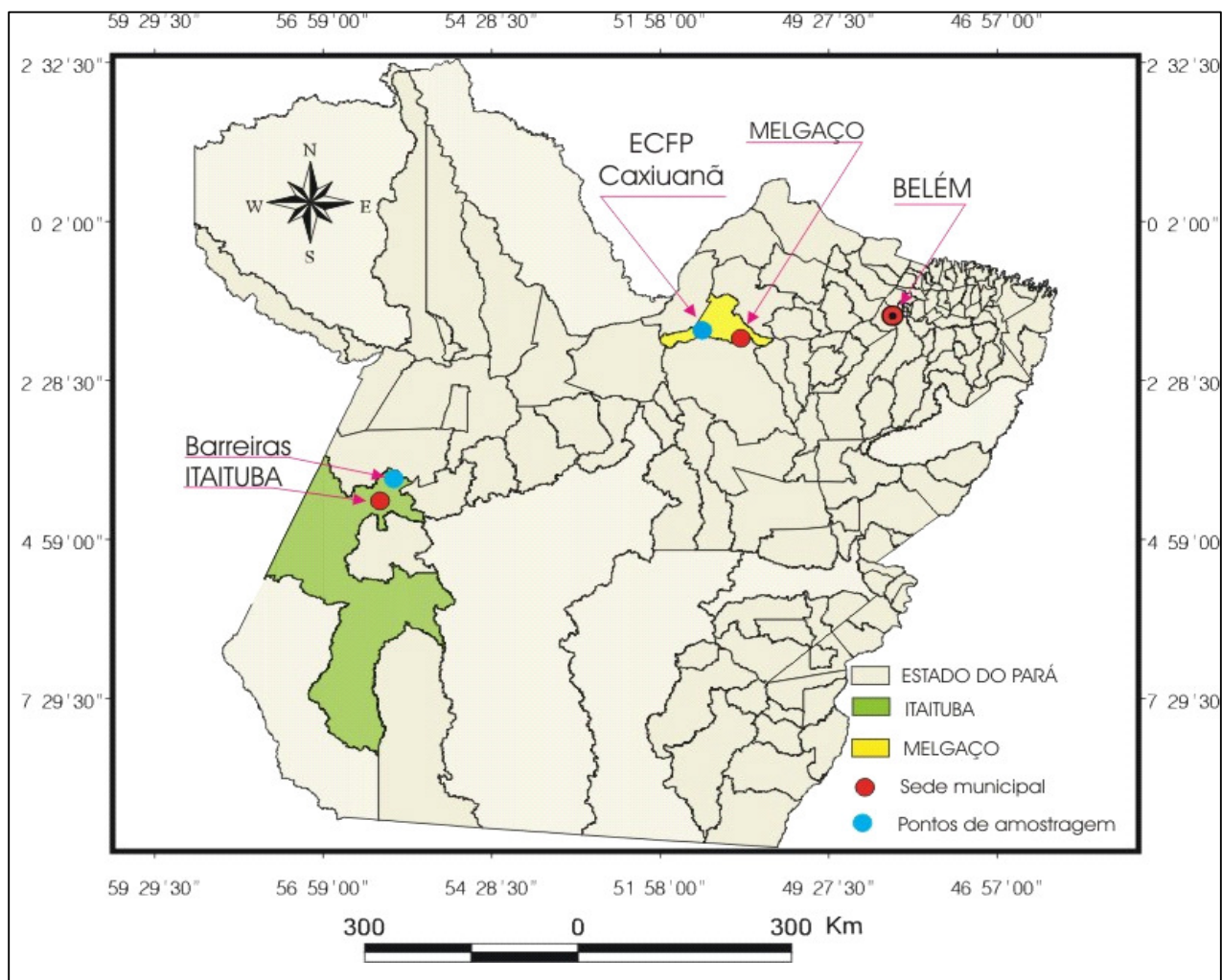


Figura 5 - Localização da área de estudo

Fonte: Geomática/ SEMAM/ IEC, 2003.

Além da atividade antrópica mínima dentro desta flona, o excelente estado da conservação de florestas e rios e sua imensa biodiversidade, que aliás é característica da floresta Amazônica, tornaram-na alvo de inúmeras pesquisas sobre a fauna e a flora local. Nesta área foram selecionados 16 pontos de coleta, os quais encontram-se descritos na tabela 2.

TABELA 2 - Descrição dos pontos de amostragem em Caxiuanã-PA, 2001.

Nº do Ponto de coleta	Caxiuanã Ponto de amostragem	Coordenadas	
		S	W
01	Ig.Aricurú	S 01 ⁰ 76581'	W 51 ⁰ 65615'
02	Ig.Grande	S 01 ⁰ 77747'	W 51 ⁰ 60632'
03	Rio Caxiuanã	S 01 ⁰ 78830'	W 51 ⁰ 60266'
04	Ig.Forno ou Retiro	S 01 ⁰ 79174'	W 51 ⁰ 57671'
05	Ig. Umarizal	S 01 ⁰ 78639'	W 51 ⁰ 55083'
06	Ig.Arauí	S 01 ⁰ 75602'	W 51 ⁰ 53664'
07	Ig.Sapucazinho	S 01 ⁰ 76077'	W 51 ⁰ 50970'
08	Ig.Tijucaquara	S 01 ⁰ 75083'	W 51 ⁰ 49254'
09	Ig.Puraquequara	S 01 ⁰ 71466'	W 51 ⁰ 47115'
10	Ig.Curuá	S 01 ⁰ 73489'	W 51 ⁰ 45367'
11	Ig.Flexal	S 01 ⁰ 71121'	W 51 ⁰ 37144'
12	Ig.Campina	S 01 ⁰ 71116'	W 51 ⁰ 37172'
13	Ig.Campinho	S 01 ⁰ 74483'	W 51 ⁰ 38692'
14	Ig.Curuazinho Esquerdo	S 01 ⁰ 73641'	W 51 ⁰ 43367'
15	Rio Caxiuanã	S 01 ⁰ 76097'	W 51 ⁰ 48604'
16	Rio Caxiuanã	S 01 ⁰ 77342'	W 51 ⁰ 43152'

2.2 COLETA DAS AMOSTRAS DE SUBSTRATO DE FUNDO DE RIO E DE IGARAPÉ

As coletas de substrato de fundo de rio e de igarapé ocorreram nos períodos de novembro a dezembro de 2000 em Barreiras, sendo coletados uma amostra de cada ponto perfazendo um total de 15, e junho de 2001 em Caxiuanã com uma amostra de cada ponto, totalizando 16 amostras.

Cerca de 300 g de material foram coletados de cada um dos pontos de Barreiras e Caxiuanã, com auxílio de pá de polipropileno esterilizado em sacos plásticos esterilizados e, quando necessário, utilizou-se a draga de Petersen (CETESB, 1988). O material coletado foi transportado para o laboratório, em caixas de isopor contendo gelo em um prazo máximo de 2 horas após a coleta.

2.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS

A partir dos 300 g do substrato de fundo coletado, cerca de 10 g foi inoculada em um frasco contendo 100 mL de TSB-*Tryptic Soy Broth* (Difco) e incubada a 37°C por 18-24 hs. Após o crescimento, a cultura foi semeada em placas de Petri contendo TSA-*Tryptic Soy Agar* (Difco) e Ágar Sangue. Foram incubadas à 37°C por 18-24 hs para obtenção de colônias isoladas. Cerca de cinco colônias de cada placa foram submetidas a prova da oxidase e coloração

de Gram. As bactérias Gram-negativas foram repicadas para ágar Stock (Difco) e, posteriormente, foram submetidas ao teste de resistência ao Hg. O fluxograma abaixo descreve esta etapa.

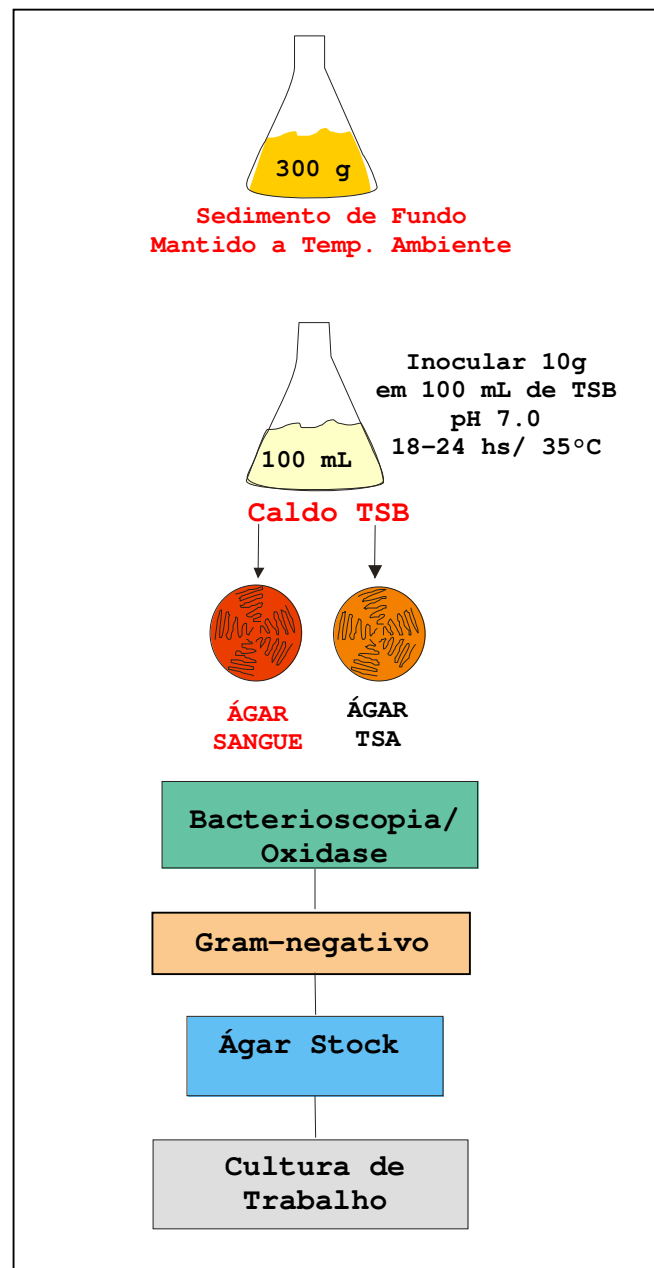


Figura 6 - Fluxograma do isolamento das Bactérias

2.4 OUTRAS BACTÉRIAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO

Foram utilizadas também neste estudo cepas padrões que fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Seção de Meio Ambiente (SEMAM/IEC) para serem usadas como referência: *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Shigella sonnei* (ATCC25931), *Shigella flexneri* (ATCC12022), *Salmonella Thyphimurium* (ATCC4028) e *Aeromonas hydrophila* (ATCC7966).

2.5 DETERMINAÇÃO *IN VITRO* DA RESISTÊNCIA AO CLORETO DE METILMERCÚRIO E CLORETO DE MERCÚRIO POR ESPECTROFOTOMETRIA

A determinação da resistência ao cloreto de metilmercúrio e cloreto de mercúrio por espectrofotometria foi realizada seguindo as recomendações de Nakamura *et al.*, (1988), com algumas modificações.

Sumariamente, fez-se um repique de cada isolado em tubo de ensaio, separadamente, contendo 5 mL de caldo TSB e incubado à 37°C por um período de 18-24 hs. Após o crescimento, 10 µL da amostra foi inoculado em cada um dos cinco erlenmeyers com capacidade para 25 mL, contendo 10 mL da solução de TSB com concentração final de MeHgCl⁺ de 0,025; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,2 mg/dl, como mostrado na figura 7. Entre as amostras foi incluído o controle negativo e uma

amostra padrão usado como branco para zerar o aparelho espectrofotométrico no momento da leitura.

Posteriormente, as amostras foram incubadas em banho-maria com agitação (8000 rpm) durante 18-24 hs à temperatura de 35-37°C. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) foram determinadas pela medida da densidade óptica do crescimento obtida pela turbidez do líquido de cultivo, utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm no equipamento espectrofotométrico 482 - FEMTO.

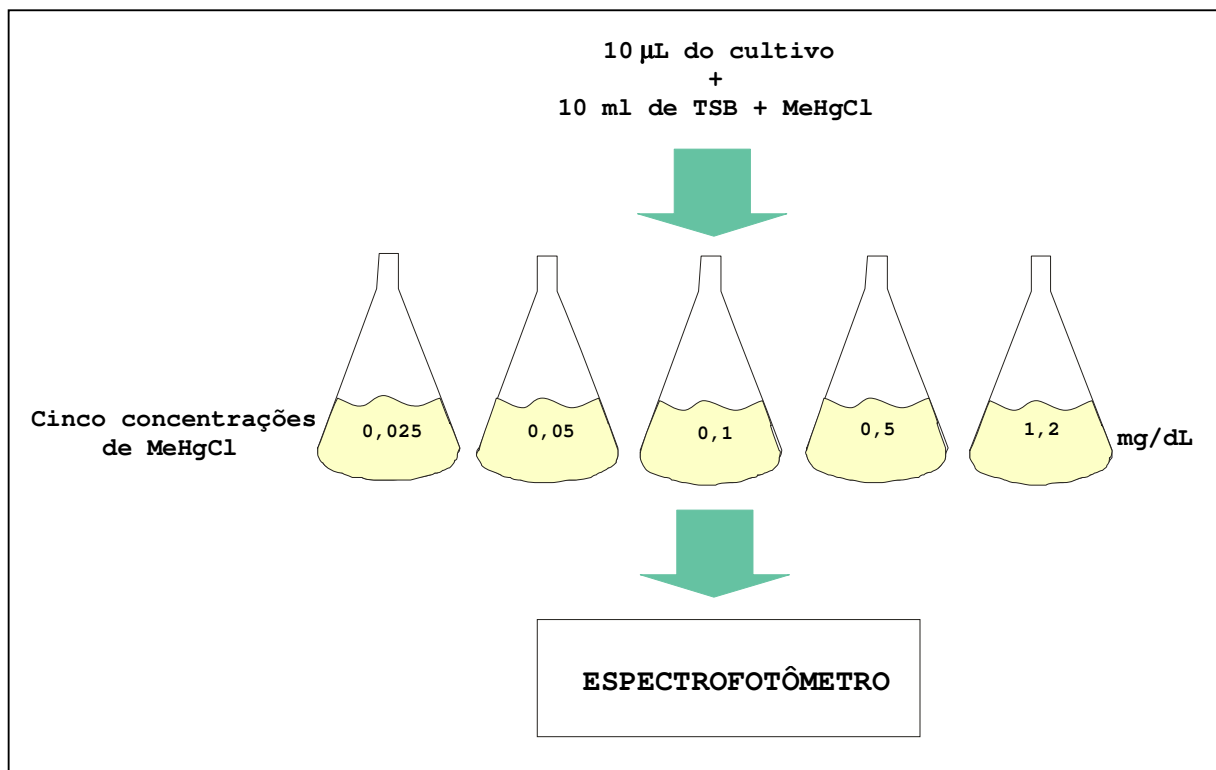


Figura 7 - Fluxograma do teste de resistência ao MeHgCl em Caldo.

O teste de resistência em caldo foi realizado nas mesmas condições de temperatura e incubação, com o composto HgCl_2 (Cloreto de mercúrio) nas concentrações 5; 50; 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$.

2.6 DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA AO CLORETO DE METILMERCÚRIO E CLORETO DE MERCÚRIO EM PLACA

O teste de resistência em placa consistiu em repicar, separadamente, cada isolado obtido para um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo TSB e incubar à 37°C por um período de 18-24 hs. Após crescimento, as amostras foram semeadas em placas de ágar TSB impregnadas com cloreto de mercúrio na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ e cloreto de metil mercúrio nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,5 e 1,2 mg/dL e mantidas à 37°C 18-24 hs. Após esse período, a leitura foi realizada sendo consideradas positivas para resistência as amostras que cresceram na placa.

2.7 EXTRAÇÃO DO DNA

2.7.1 Extração de DNA Genômico

A extração do DNA genômico por Fervura e Congelamento seguiu as recomendações de Baloda *et al.* (1995) e Starnbach *et al.* (1989):

- Um repique da cultura de trabalho para 3 mL de caldo Luria foi submetido à temperatura de 35°C com agitação de 150 rpm durante a noite;
- 1,5 mL da cultura, foram transferidas para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e centrifugada a 12000 rpm por 2 minutos;
- O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em 400 μ L de água purificada (milli-Q) estéril;
- A suspensão foi levada ao banho fervente (100°C) por 10 minutos e imediatamente após, levadas a temperatura de -20°C para congelamento.

2.8. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA CARACTERIZAÇÃO DO OPERON *MER* DE RESISTÊNCIA AO HG

Na PCR foram realizadas 19 combinações com os diferentes iniciadores utilizados para os genes que compõem o operon *mer*. Todos os isolados foram submetidos à estas combinações. Na tabela 3 estão as 19 combinações e o esquema seguinte (figura 8) demonstra as estratégias.

Tabela 3 - Combinações utilizadas com os iniciadores para caracterização do operon

	Combinações
1	<i>merR1 - merD1</i>
2	<i>merR1 - merA0</i>
3	<i>merR1 - merT1</i>
4	<i>merR1 - merT2</i>
5	<i>merR1 - merA5</i>
6	<i>merR2 - merT1</i>
7	<i>merR2 - merT2</i>
8	<i>merR2 - merA5</i>
9	<i>merP1 - merA0</i>
10	<i>merP1 - merA5</i>
11	<i>merP1 - merD1</i>
12	<i>merP2 - merA2</i>
13	<i>merC1 - merC2</i>
14	<i>merC1 - merA0</i>
15	<i>merF1 - merF2</i>
16	<i>merA1 - merA5</i>
17	<i>merA6 - merD1</i>
18	<i>merB1 - merB2</i>
19	<i>merD2 - merD3</i>

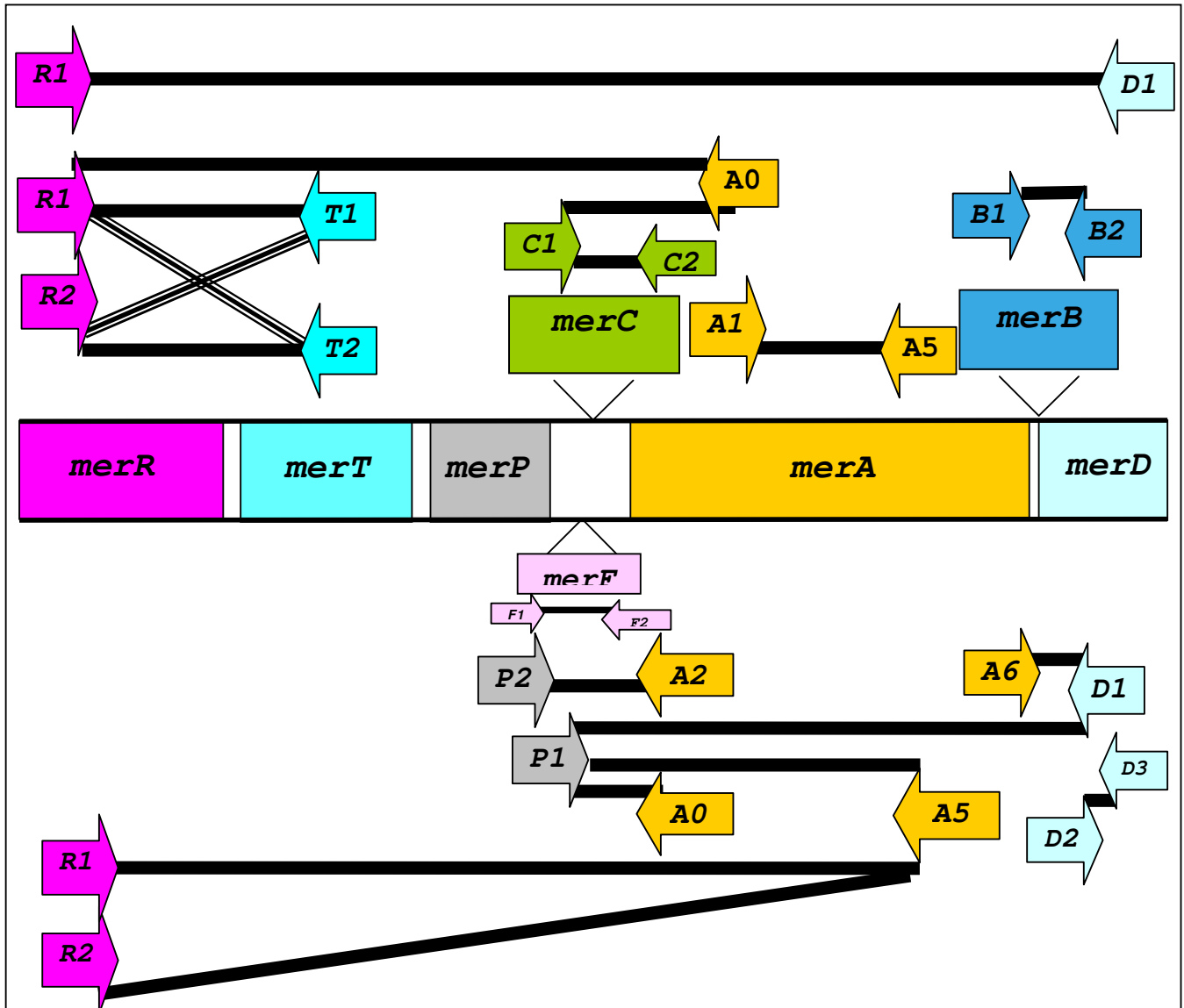


Figura 8 - Estratégias de PCR utilizadas para caracterização do operon *mer*

2.9. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para a amplificação das regiões específicas do operon *mer* das bactérias em estudo, foram realizadas reações com um volume final de 50 μL . Foram adicionados para cada reação: água purificada (milli-Q) estéril, tampão de reação 1X (Gibco-BRL), 1.5-3.0 mM de cloreto de magnésio- MgCl_2 (Gibco-BRL), 0,4 mM de cada dNTP (*ultrapure dNTP set* Gibco-BRL n.º cat27-2035-01), 3 μL do DNA total extraído por fervura e congelamento, 250 ng de cada oligonucleotídeo (tabela 4) e 1.5-2.0 U da enzima Taq Polimerase I (Gibco-BRL n.º cat. 18038-042).

A reação ocorreu no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) sob as seguintes condições:

Etapas	Denaturação	Anelamento	Polimerização
Pré-PCR	94°C/5min.	-	-
35 ciclos	94°C/30seg.	55-64°C/30Seg.	72°C/30Seg.
Extensão			72°C/10min.
Manutenção		4°C	

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia da polimerase

mer primers	Direção	Posição	Seqüência	Temp. Anel.	Referência
Rf	F	-	AAG CAC GCT AAG GCG TAG	55°C	Este estudo
Rr	R	-	CTG ACC ATT GGC GTT T	55°C	Este estudo
PCf	F	-	CCG ATC ACT GTC AAG	55°C	Este estudo
PCr	R	-	AAT GAC GAC GAC CTG CA	55°C	Este estudo
A1	F	2140-2159	ACC ATC GGC GGC ACC TGC GT	64°C	Liebert et al.,1997
A5	R	3375-3357	ACC ATC GTC AGG TAG GGG AAC AA	64°C	Liebert et al.,1997
B1	F	382-402	TCG CCC CAT ATA TTT TAG AAC	57°C	Liebert et al.,1997
B2	R	883-863	GTC GGG ACA GAT GCA AAG AAA	57°C	Liebert et al.,1997
R1	F	458-477	GCG GAT TTG CCT CCA CGT TGA	60°C	Liebert et al.,1997
R2	F	474-492	ACG GAT GGT CTC CAC ATT G	60°C	Liebert et al.,1997
T1	R	682-661	CCA GGC AGC AGG TCG ATG CAA G	60°C	Liebert et al.,1997
T2	R	698-679	CGA GGC AGC AAG CCG AGG CG	60°C	Liebert et al.,1997
P1	F	1232-1251	GGC TAT CCG TCC AGC GTC AA	59°C	Liebert et al.,1997
P2	R	1250-1269	TGC GGG CTA CCC ATC ATC AG	59°C	Liebert et al.,1997
C1	F	1406-1386	CAT CGG GCT GGG CTT CTT GAG	60°C	Liebert et al.,1997
C2	R	1750-1730	CAT CGT TCC TTA TTC GTG TGG	60°C	Liebert et al.,1997
F1	F	1331-1351	CTC GTC GCG CTG TGT TGC TTC	59°C	Liebert et al.,1997
F2	R	1490-1470	CAT CGG CTT GGC GTT TTC GTT	59°C	Liebert et al.,1997
A0	R	1365-1342	GTC GCA GGT CAT GCC GGT GAT TTT	59°C	Liebert et al.,1997
A2	R	1573-1554	GGG TGG CGC AGG ATG TGC AG	59°C	Liebert et al.,1997
A6	F	3346-3372	GCC GAC CAG TTG TTC CCC TAC CTG ACG	62°C	Liebert et al.,1997
D1	R	1186-1165	CGC ACG ATA TGC ACG CTC ACC C	62°C	Liebert et al.,1997
D2	F	3138-3157	CCA GGC GGC TAC GGC TTG TT	62°C	Liebert et al.,1997
D3	R	3356-3336	GGT GGC CAA CTG CAC TTC CAG	63°C	Liebert et al.,1997

2.10 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Géis de agarose à 0,8-2,5 % foram preparados como descrito por Sambrook *et al.* (1989). Foram dissolvidos 0,8-2,5 g de agarose (Gibco-BRL) em 100 mL de TAE 1 X (Concentração 50 X para estoque: 242 g de Tris-base; 57,1 mL de ácido acético glacial; 100 mL EDTA 0,5 M pH 8,0; 1000 mL de água destilada q.s.p. Concentração 1 X. Para uso: 20 mL de TAE 50 X; 980 mL água destilada q.s.p.) e aquecidas até total dissolução. As amostras e o marcador de peso molecular (Gibco-BRL) foram submetidos à eletroforese em tampão TAE 1 X, a uma corrente de 70-90 V, por 30-60 minutos, para análise do DNA. Foram, então, corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizados através de luz ultravioleta.

2.11 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO USANDO O KIT BIG DYE TERMINATOR DA ABI

- 2 uL do tampão BigDye
- 6 uL do tampão de diluição 5x
- 3,2 pmol do primer
- 1 ug do DNA
- Completou-se com água para volume final de 20 uL.

Condições da reação de polimerização:

96°C15 seg.	
50°C10 seg.	25 X
60°C 4 min.	
4°C ∞	

Ao final, a reação foi precipitada conforme descrito abaixo:

- Adicionar 16 uL de água milli-Q e 64 uL de etanol absoluto à reação de seqüenciamento;
- Misturar em um vortex por 15 seg., deixar a temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida centrifugar por 20 minutos à 14.000 rpm;
- Desprezar o sobrenadante e em seguida colocar 250 uL de etanol à 70 %;
- Misturar por 15 seg. no vortex e em seguida centrifugar por 10 minutos à 14.000 rpm;
- Retirar todo o etanol cuidadosamente com uma pipeta e em seguida deixar secar o precipitado em uma estufa à 37 °C.

A reação de seqüenciamento foi então separada em gel de poliacrilamida em seqüenciador automático 377 da Applied Biosystem em corrida de 7 horas de duração.

Os cromatogramas obtidos foram editados utilizando-se o programa CRHOMAS. As seqüências obtidas foram então analisadas utilizando-se o programa BLAST fornecido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI), disponível no endereço eletrônico: www.ncbi.nlm.nih.gov.

2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos resultados, foi utilizado o programa Bio Estat versão 2.0 para aplicação dos testes não paramétricos qui-quadrado com correção de Yates, o de Mann-Whitney com nível de significância estabelecido em 5 % ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

A partir do isolamento bacteriano de amostras de substrato de fundo de rio, obteve-se um total de 107 isolados Gram-negativos, sendo 82 do município de Barreiras e 25 de Caxiuanã, que foram submetidos a uma identificação bioquímica prévia. Morfologicamente apresentaram-se na forma de cocos, bacilos e cocobacilos. A tabela 5 mostra o total de bactérias Gram-negativas isoladas nas duas áreas.

Tabela 5 - Distribuição dos isolados bacterianos Gram-negativos de acordo com as áreas estudadas.

Área	Nº de isolados
Barreiras	82
Caxiuanã	25
Total	107

A análise da resistência bacteriana entre 107 isolados Gram-negativos de Barreiras e Caxiuanã frente ao CH₃HgCl, mostrou diferença significativa somente na concentração de 0,1 mg/dL de CH₃HgCl ($p < 0,01$), sendo as bactérias isoladas de Barreiras mais resistentes quando

comparadas com a área controle. Diferente das demais concentrações, a concentração de 0,025 mg/dL de MeHgCl apresentou resistência bacteriana maior na área controle (Caxiuanã), porém, o p valor não foi significativa. A tabela 6 representa esses resultados.

Tabela 6 - MIC referentes aos isolados bacterianos Gram-negativos de Barreiras e Caxiuanã, Pará, 2002.

[] MeHgCl ⁺	U=	p=	Média Aritmética		Coeficiente de variação	
			MIC Gram - Bar.	MIC Gram - Cax.	Gram - Bar.	Gram - Cax.
0,025	897,50	0,3921	166,42	169,96	9,03	5,96
0,05	935,00	0,5641	160,96	157,08	12,79	15,16
0,1	626,50	0,0041	154,85	149,56	19,46	21,60
0,5	988,00	0,8553	53,41	35,96	127,36	173,68
1,2	965,00	0,7237	1,45	0,20	421,47	322,75

MIC-concentração inibitória mínima; Bar.-Barreiras; Cax.-Caxiuanã; U= - teste de Mann-Whitney; p= p valor

Na análise de resistência em caldo frente ao cloreto de mercúrio (HgCl₂) todos os 107 isolados e as cepas padrões cresceram no caldo TSB contendo o cloreto de mercúrio.

Em relação ao teste de resistência realizado em placas Ágar TSB impregnadas com cloreto de mercúrio (20 µg/mL), do total dos 107 testados e cepas padrões, apenas

duas amostras, sendo uma de cada área, mostrando resistência a este composto após crescerem na placa.

Estas duas amostras foram caracterizadas bioquimicamente para determinação da espécie utilizando a metodologia convencional de identificação para bactérias e o sistema semi-automatizado mini Api da *Biomerieux* (cartela ID 32 GN). A amostra de Caxiuana mostrou tratar-se de um isolado de *Acinetobacter baumannii* e a de Barreiras *Pseudomonas stutzeri*.

Os 107 isolados e as cepas padrões foram submetidos à reação em cadeia da polimerase para verificar a presença dos genes essenciais (*merR*, *merT*, *merP* e *merA*) e acessórios (*merC*, *merF*, *merB* e *merD*) do operon *mer* (Liebert et al., 1997). Observou-se que utilizando os iniciadores descritos na tabela 3 para todos os isolados, apenas o *Acinetobacter baumannii*, apresentou as seguintes frações do operon *mer*: *merR*, *merT*, *merP*, *merC*, *merA* e *merD*.

Na figura 9, têm-se o esquema do resultado da PCR do *Acinetobacter baumannii*. A figura 10 mostra o gel de eletroforese 1,5 %, corado com brometo de etídio com os resultados das amplificações da PCR, cujos produtos foram seqüenciados.

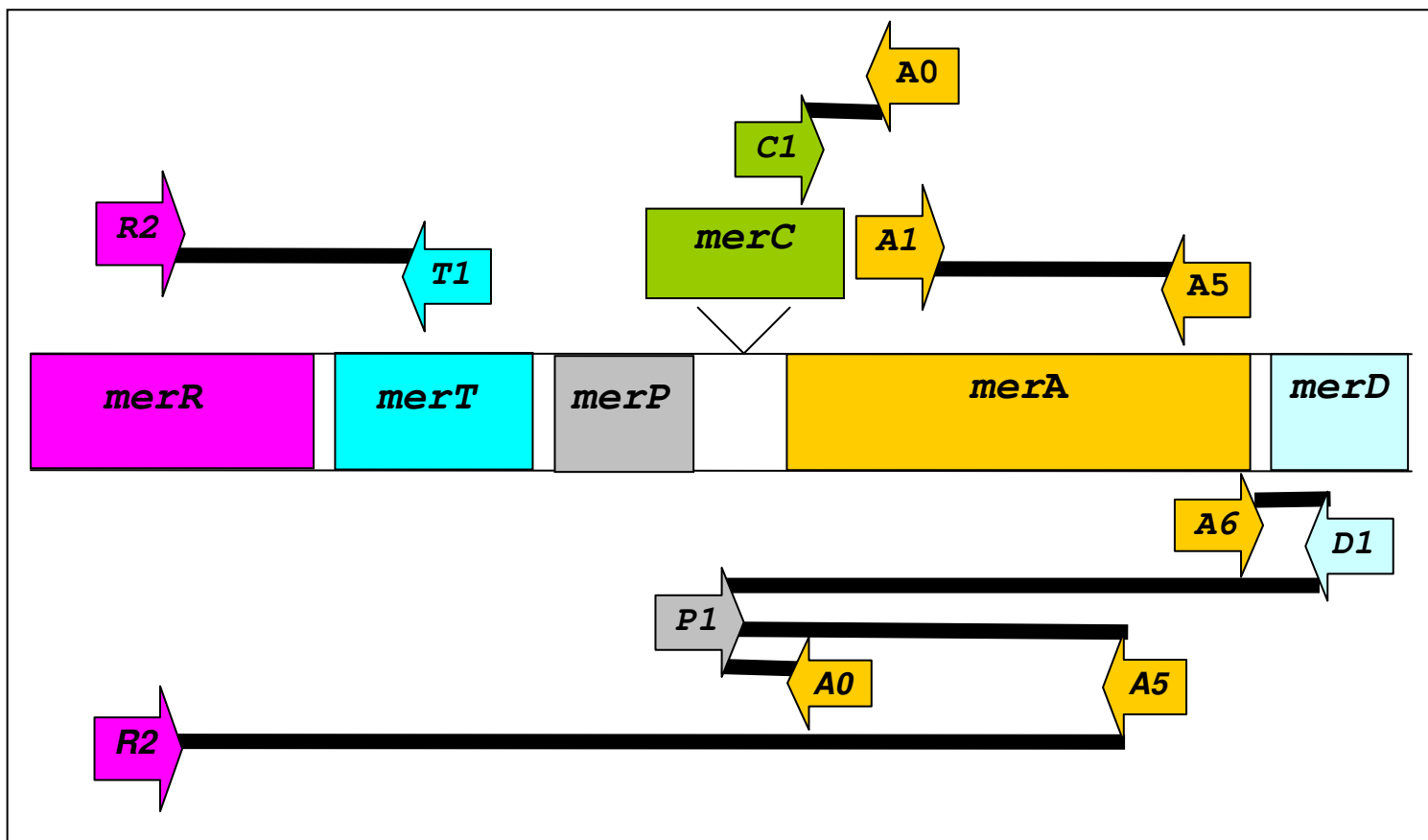


Figura 9 - Resultado do PCR para o operon *mer*

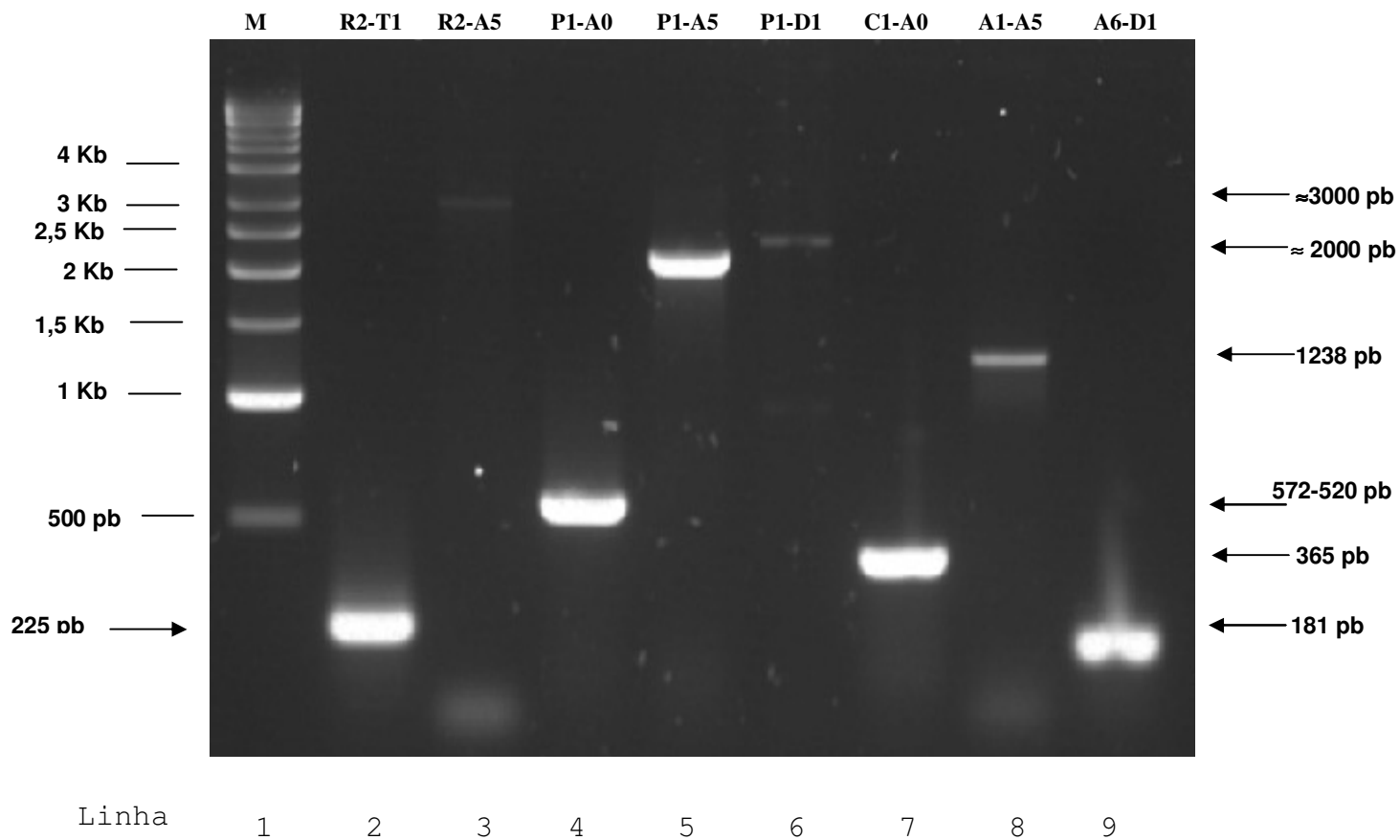


Figura 10 - Produtos obtidos da PCR alvo-específica em gel de agarose 1,5 % para os genes do operon *mer* do *Acinetobacter baumannii* Linha 1 - *merP1-A0*, linha 2 - marcador de peso molecular 1 kb, linha 3 - *merR2-T1*, linha 4 - *merP1-A0*, linha 5 - *merP1-A5*, linha 6 - *merP1-D1*, linha 7 - *merC1-A0*, linha 8 - *merA1-A5*, linha 9 - *merA6-D1*.

O isolado de *Pseudomonas stutzeri*, mostrou resultados positivos na PCR somente em relação ao segmento *merP1-A0*, considerando os iniciadores descritos na tabela 3.

O sequenciamento de todos produtos obtidos nas reações em cadeia da polimerase utilizando como alvo o DNA do *Acinetobacter baumannii* deu origem a uma seqüência de 3060 nucleotídeos (figura 11), onde os iniciadores utilizados para amplificação das diferentes frações do operon *mer* encontram-se destacados pela cor vermelha e os nucleotídeos de cor azul divergiram do iniciador utilizado, mas não impediram a amplificação da região.

Observou-se no operon seqüenciado do *Acinetobacter baumannii* a seguinte organização: *merR*, *merT*, *merP*, *merC*, *merA* e *merD*, característica dos microrganismos que apresentam estreito espectro de resistência ao Hg^{2+} . A análise da seqüência no *GenBank* mostrou 100 % de identidade com uma seqüência de nucleotídeos (2221-5280) cujo n° de acesso no Genbank é AJ251307, e refere-se ao operon *mer* de um isolado de *Acinetobacter calcoaceticus*. A tabela 7 resume estes dados.

Tabela 7 - Análise da seqüência (GenBank AJ251307) do operon *mer*.

Do nt	Até nt	Descrição	Porcentagem de Similaridade com:
2221	2268	merR parcial	100 % merR A. calcoaceticus
2340	2690	merT	100 % merT A. calcoaceticus
2704	2979	merP	100 % merP A. calcoaceticus
3007	3432	merC	100 % merC A. calcoaceticus
3471	5156	merA	100 % merA A. calcoaceticus
5174	5280	merD parcial	100 % merD A. calcoaceticus

A seqüência do operon *mer* presente no isolado *Acinetobacter baumannii* apresentou também alta identidade, entre 100 % a 97 %, e mesma organização de outros operons *mer* presentes em isolados de *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter sp.*

Quanto ao amplicon *P1-A0* obtido para a *Pseudomonas stutzeri*, este apresentava o tamanho de aproximadamente 200 pb e seu sequenciamento revelou uma composição de 70 nt apresentando similaridade com uma fração do gene *merP* existente em operons *mer* encontrados em *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*.

Comparando a seqüência do operon *mer* presente nestas cepas com aquela encontrada no *Acinetobacter baumannii*, verifica-se apenas 86 % de similaridade.

Analisando outras seqüências de operons *mer* de *Pseudomonas* existentes no GenBank, Z00027 e U80214, observa-se que estas apresentaram em torno de 88 % de identidade com o operon *mer* de *Acinetobacter*, além de não carregarem o gene *merC*.

01	CGCCTTGCCA	AAAACGCCAA	TGGTCAGATT	CTCAAAATTA	ATTTCATAT	CGCTTGACTC	CGTACATAAC	TACGGAAGTA	Final de merR ↓
81	AGCTTAAGCT	ATCCAAACCA	AATTTGAAAG	GACAAGCGTA	TGTCTGAACC	ACAAAACGGG	CGCGGCGCGC	TCTTCGCCGG	Início de merT ↓
					← merT1				
161	TGGGCTGGCC	GCCATTCTTG	CGTCGGCCTG	CTGCCTGGGG	CCGCTGGTTT	TGATCGCCTT	GGGGTTCAGC	GGGGCATGGA	
241	TCGGCAACCT	GACGGTATTG	GAGCCGTATC	GGCCGATCTT	CATCGGCGCG	GCGCTGGTTG	CACTGTTCTT	TGCTGGCCGG	
321	CGCATCGTCC	GACCGACCGC	AGCCTGCAAG	CCGGGCGAGG	TGTGCGCGAT	TCCGCAAGTG	CGCACCACCT	ACAAGCTCAT	
401	TTTCTGGTTC	GTCGCCGTGT	TGGTCTTGGT	CGCGCTTGGT	TTTCCCTACG	TCATGCCATT	TTTCTACTAA	TCAGGAGTTC	Final de merT ↓
	↓	Início de merP							
481	ATCATGAAAA	AGCTGTTTGC	CTCCCTCGCT	CTCGCCGCTT	TCGTTGCCCC	CGTGTTCGCC	GCCACTCAGA	CCGTAACGCT	
561	GTCCGTGCCT	GGCATGACCT	GCGCCTCTTG	CCCGATCACT	GTCAAGCACG	CGCTTCCAA	GGTTGAGGGC	GTGAGCAAGA	
641	CCGACGTAAG	TTTCGACAAG	CGCCAGGCCG	TCGTACCTT	CGACGATGCC	AAGACCAACG	TCCAGAAGTT	GACCAAGGCG	
		→ merP1		Final de merP ↓			Início de merC ↓		
721	ACCGAGGACG	CGGGCTATCC	GTCCAGCCTC	AAACGCTGAT	CCGTTAACCG	AACTCGGGAG	CGACACATGG	GACTCATCAC	
801	GCGCATCGCT	GGCAAACCG	GCGCGCTCGG	CAGCGTCGTT	TCGCGATGG	GCTGCGCCG	CTGTTTTCTT	GCCATCGCCA	
		→ merC1							
881	GCTTTGGCGC	GGCCATCGGA	CTGGGCTTCT	TGAGCCAGTA	CGAGGGGCTA	TTCATTGGCA	TCCTGCTGCC	GATGTTCCGC	
961	GGCATCGCGT	TACTCGCCAA	TGCTATCGCT	TGGCTCAATC	ATCGACAGTG	GCGACGCACG	GCGCTCGGCA	CGATAGGCCC	
1041	GATCTTGGTG	CTGGCAGCGG	TGTTTTTAAT	GCGGGCTTAC	GGCTGGCAGA	GCGGTGGACT	GCTCTATGTC	GGCCTGGCCT	
1121	TGATGGTTGG	GGTGTGCGTC	TGGGATTTCA	TCTCGCCAGC	ACATCGCCGC	TGCGGGCCGG	ACAGCTGTGA	ATTGCCAGAA	
1201	CAACGTGGCT	GACGGCAACA	GCCGTAGCCA	CCACAGAAAA	GGAAAAATAC	ATGACCACCC	TGAAAATCAC	CGGGATGACC	Final de merC ↓
									Início de merA ↓
	merA0 ←								
1281	TGCGACTCGT	GCGCGGCTCA	CGTCAAGGAA	GCCTTGAGA	AAGTGCCCGG	CGTGAATCG	GCGTGGTGT	CCTATCCGAA	
1361	GGGCACAGCG	CAACTCGCCA	TGAGGCGGG	CACGTCATCG	GATGCGCTGA	CTACCGCCGT	GGCCGGACTG	GGCTACGAGG	
1441	CAACGCTTGC	CGATGCGCCA	CCGACGGACA	ACCGCGCCGG	CCTGCTCGAC	AAGATGCGCG	GCTGGATAGG	GGCCGCTGAT	
1521	AAGCCCAGTG	GCAACGAACG	CCC GTTGCAG	GTCGTCGTA	TTGGTAGCGG	TGGCGCGGCA	ATGGCCGCAG	CACTGAAGGC	
					→ merA1				
1601	CGTCGAGCAA	GGCGCGCACG	TCTCGCTGAT	CGAGCGCGGC	ACCATCGGCG	GCACCTGCGT	CAACGTCGGC	TGCGTGCCGT	
1681	CCAAGATCAT	GATTCGCGCC	GCCACATCG	CCCATTACG	TCGGGAAAGT	CCGTCGACG	GCGGTATCGC	GGCGACTGTG	
1761	CCTGCGATTG	ACCGCAGCAA	ACTACTGGCC	CAGCAGCAGG	CGCGCGTCTGA	AGAAGTGC	CATGCCAAGT	ACGAAGGCAT	
1841	TCTGGACGGC	AACCCGGCCA	TCACCGTTGT	ACATGGTGAG	GCGCGTTTCA	AGGATGAGCA	GAGCCTGGTC	GTCCGTTTAA	
1921	ACGATGGTGG	CGAGCGCGTG	GTAGCTTTCG	ACCGTGTCTT	AGTCGCCACG	GGTGCCAGCC	CGGCCGTGCC	GCCGATTCCG	
2001	GGCCTGAAAG	AGTACCCCTA	CTGGACTTCG	ACCGAGGCCC	TGGTCAGCGA	CACCCTTCCC	GAACGCCTAG	CCGTGATCGG	
2081	CTCGTCCGTG	GTCGCGCTGG	AACTGGCGCA	AGCCTTCGCC	CGGCTGGGCA	GCCAGGTCAC	GATCCTAGCT	CGCAACACGC	
2161	TGTTCTTCCG	CGACGACCCG	GCCATCGGCG	AGGCCGTTAC	AGCCGCGTTC	CGTGCCGAAG	GGATCAAGGT	ATTGGAACAC	
2241	ACGCAAGCCA	GCCAGGTTCG	GCATGTGGAC	GGCGAATTCG	TGCTGACCAC	CGGGTACGGT	GAAATACGCG	CCGACCAGCT	
2321	GCTGGTCCGC	ACTGGCAGGG	CACCGAACAC	GCGCAGCCTG	GCATTGGAAG	CGGCTGGAGT	CGCTGCCAAT	GCGCAGGGGG	
2401	CCATCGTCAT	CGACAAGGGC	ATGCGCACCA	GTACGCCACA	CATTATGCG	GCTGGCGACT	GCACCGACCA	GCCTCAGTTC	
2481	GTCTATGTGG	CGGCAGCGGC	CGGCACCCGT	GCTGCGATCA	ACATGACTGG	CGGCGATGCG	GCCCTGGACC	TGACCGCAAT	
2561	GCCGGCCGTG	GTGTTACCG	ACCCGAGGT	CGCCACCGTG	GGCTACAGCG	AGGCGGAAGC	ACATCACGAC	GGGATCGAGA	
2641	CCGACAGTCC	CACCTTGACC	TGGACAACG	TGCCCGTGC	GCTTGCCAAC	TTCGACACAC	CGGCTTCAT	CAAGCTGGTC	
2721	ATCGAGGAAG	GTAGCGGACG	GTCATCGGC	GTGCAAGCGG	TGGCCCCGGA	AGCGGGTGAA	CTGATCCAGA	CGGCGGTGCT	
				→ merA6		merA5 ←			
2801	CGCCATTTCG	AACCGTATGA	CCGTGCAGGA	ACTGCGCGAC	CAATTGTTCC	CCTACCTGAC	CATGGTTCGAA	GGGCTGAAGC	
2881	TCGCGGCGCA	GACCTTCAGC	AAGGACGTGA	AGCAGCTTTC	GTGCTGCGCC	GGATGAGGAA	AAGGAGGTGT	TCAATGAGCG	Final de merA ↓
									Início de merD ↓
									merD1 ←
2961	CCTACACAGT	GTCCCGGCTG	GCCCTTGATG	CCGGGGTGG	CGTGCATATC	GTGCGCGACT	ACCTGCTGCG	CGGATTGCTA	
3041	CGGCCGGTGC	CGTGCACCAC							Final de merD ↓

Figura 11 - Sequência do operon *mer* do *Acinetobacter baumannii*

4 DISCUSSÃO

Pesquisas envolvendo resistência bacteriana ao mercúrio se fazem necessárias e têm sido realizadas no sentido de buscar conhecimentos acerca da adaptação da biota aquática aos níveis naturais ou antropogênicos de Hg no ambiente (Nakamura, *et al.*, 2000; Nakamura, *et al.*, 2001).

Alguns mecanismos relacionados à resistência ao mercúrio especificamente encontram-se descritos (Mukhopadhyay, 1991; Hamlet, *et al.*, 1992; Hobman *et al.*, 2002). Entretanto são raros os estudos mostrando a participação e os mecanismos de resistência ao mercúrio nas bactérias.

No Japão, trabalhos realizados com bactérias isoladas de áreas impactadas, principalmente da Baía de Minamata, e áreas não impactadas pela contaminação com mercúrio e/ou seus compostos, demonstraram que os microrganismos oriundos de área impactada têm maior capacidade de resistir a presença deste elemento tóxico (Nakamura *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1988). Neste sentido, resultados semelhantes foram obtidos em nosso estudo visto que, para uma dada concentração de MeHgCl, os isolados oriundos de Barreiras mostraram uma tolerância maior à presença deste metal.

Em contrapartida, estudos realizados no mesmo período em Barreiras-PA, demonstraram a média das concentrações de Hg encontradas em amostras de sedimento sendo de 0,059 $\mu\text{g/g}$, com valores máximo e mínimo de 0,1551 $\mu\text{g/g}$ e 0,0068 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Já em Caxiuanã, os valores variaram entre 0,011 e 0,452 $\mu\text{g/g}$ e média de 0,202 $\mu\text{g/g}$ (Mascarenhas *et al.*, 2002). Como podemos observar, Barreiras (área impactada) apresentou níveis de Hg no sedimento menores comparados a Caxiuanã.

Este fato pode ser explicado pelas características morfológicas e composição química que constituem o sedimento das duas áreas. Em Barreiras, o sedimento é arenoso com uma dinâmica grande por estar às margens do rio Tapajós fazendo com que o composto seja facilmente deslocado. Já em Caxiuanã, o sedimento é argiloso fazendo com que o composto fique retido mais facilmente no sedimento. Sua composição química é muito grande fazendo parte os ácidos húmicos que têm capacidade de fixar Hg e sua dinâmica é muito menor .

A tolerância maior ao mercúrio em bactérias isoladas da região impactada pela garimpagem (Barreiras) em relação aquelas da área controle (Caxiuanã) chamaram atenção em função das concentrações deste metal nas amostras de

sedimento, pois, o nível de Hg em Caxiuanã é naturalmente maior diferindo do que ocorre em Barreiras onde a comunidade aquática teve que se adaptar às mudanças do ambiente provavelmente provocadas, pela garimpagem.

A resistência ao Hg esta presente em vários gêneros de bactérias e tem sido relatada em isolados clínicos, comensais e ambientais. A resistência bacteriana ao mercúrio está principalmente associada a expressão de genes presentes no operon *mer*. Estes fazem parte do genoma de transposons que os disseminam (Hobman *et al.*, 2002).

Os operons *mer* possuem uma grande variabilidade tanto em sua composição (presença ou não de genes) quanto na seqüência destes genes (Silver & Phung, 1996). Geralmente eles apresentam a seguinte composição nas bactérias de resistência de espectro limitado: *merR*, *merT*, *merP* e/ou *merC/merF*, *merA* e *merD*. Nos casos em que a bactéria apresenta resistência de amplo espectro, o *merB* faz parte do operon (Nascimento & Souza, 2003).

Todos os isolados foram submetidos à pesquisa dos genes que compõem o operon *mer*. Em um deles, oriundo de Caxiuanã, foi detectada a presença das regiões *RTPCAD* do operon *mer*, e outro originado de Barreiras observou-se a região *P1-A0*. Utilizando testes de resistência ao mercúrio *in*

vitro constatou-se que o genótipo está de acordo com a avaliação fenotípica realizada nestes isolados. Nesta testagem apenas esta amostra portadora do operon *mer* e a amostra apresentando apenas positividade para a reação de amplificação *P1-A0*, mostraram-se resistentes ao mercúrio.

O segmento do operon *mer* presente no *Acinetobacter baumannii*, apresenta a seguinte organização: *merR*, *merT*, *merP*, *merC*, *merA* e *merD*, e estes genes tem 100 % de similaridade com seqüência contida no GenBank obtida de uma bactéria do mesmo gênero. Trata-se de um *Acinetobacter calcoaceticus* isolado de solo de uma mina de mercúrio em uma das Repúblicas da União Soviética. Neste isolado o operon *mer* faz parte do transposon 5047, pertencente a família do transposon 21 (Tn21). Esta família de transposons encontra-se amplamente distribuída em isolados ambientais e clínicos de bactérias Gram-negativas em todo o mundo (Liebert *et al.*, 1999).

Nosso achado é mais uma evidência da ampla distribuição destes elementos, já que se tem uma bactéria de uma região do extremo oriente no hemisfério norte, compartilhando uma mesma seqüência associada a elemento genético móvel, um transposon, com uma bactéria oriunda da região amazônica.

O isolado de *Pseudomonas stutzeri* pode estar carreando um operon *mer* que, pela diversidade de seqüência presente nos genes que o compõem, não pode ser recuperado com os reagentes (iniciadores) utilizados em nossos ensaios e será objeto de investigações futuras.

5. CONCLUSÕES

1. Os isolados de Barreiras tiveram uma tolerância maior ao cloreto de metil-mercúrio quando comparados aos de Caxiuanã;
2. Os isolados *Acinetobacter baumannii* (Caxiuanã) e *Pseudomonas stutzeri* (Barreiras) são resistentes ao cloreto de mercúrio e portanto volatilizam Hg;
3. As amostras testadas não apresentam resistência ao cloreto de metil-mercúrio e portanto não são capazes de demetilar compostos organomercuriais;
4. A seqüência nucleotídica do operon *mer* do *Acinetobacter baumannii* está assim organizada *merR*, *merT*, *merP*, *merC*, *merA* e *merD*;
5. O isolado de *Acinetobacter baumannii* apresenta resistência de espectro limitado ao mercúrio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKIR, F.; DAMLUJI, S.F.; AMIN-ZAKI, L.; MURTADHA, M.; KHALIDI, A.; Al-RAWI, N.Y.; TIKRITI, S.; DAHAHIR, H.I.; CLARKSON, T.W.; SMITH, J.C.; DOHERTY, R.A. Methylmercury poisoning in Iraq. **Science**, **181**:230-241, 1973.
- BALODA, S.B.; KROVACEK, K.; ERICSSON, L.; LINNE, T.; MANSSON, I. Detection of aerolysin gene in *Aeromonas* strains isolated from drinking water, fish and foods by the polymerase chain reaction. **Comparative Immunology and Microbiology Infectious Disease**, **18**:17-26, 1995.
- BARKAY, T.; FOUTS, D.L.; OLSON, B.H. Preparation of a DNA gene probe for detection of mercury resistance genes in Gram-negative bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, **49**:686-692, 1985.
- BARKAY, T.; MILLER, S.M.; SUMMERS, A.O. Bacterial Mercury from Atoms to Ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, **27**:355-384, 2003.
- BELLIVEAU, B.H.; TREVORST, J.T. Mercury resistance and detoxification in bacteria. **Applied Organometallic Chemistry**, **3**:283-294, 1989.
- BRABO, E.S. Contaminação por Mercúrio dos Rios Crepori e Marupá - Bacia do Tapajós. **Dissertação de Mestrado**, Belém: Universidade Federal do Pará, 1992. 120 p.

- BRITO FILHO, D. **Toxicologia Humana e Geral** 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1998.172p.
- BROWN, N.L.; SHIH, Y.-C.; LEANG, C.; GLENDINNING, K.J.; HOBMAN, J.L.; WILSON, J.R. Mercury Transport and Resistance. **Biochemical Society Transactions**, **30**:715-718, 2002.
- CÂMARA, V.M.; COREY, G. **Epidemiologia e Meio Ambiente: o caso dos garimpos de ouro no Brasil**. Metepec, México: ECO, 1992. p.89.
- CÂMARA, V.M.; FILHOTE, M.I.F.; LIMA, M.I.M.; ALHEIRA, F.V.; MARTINS, M.S.; DANTAS, T.O.; LUIZ, R.R. Metodologia para Prevenir Exposição ao Mercúrio em Adolescentes de Garimpos de Ouro em Mariana, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, **12**:149-158, 1996.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Água. 1988. 150 p.
- CHEN, S.; WILSON, D.B. Construction and Characterization of *Escherichia coli* Genetically Engineered for Bioremediation of Hg²⁺ - Contaminated Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, **63**:2442-2445, 1997.

- CLARKSON, T.W.; FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; SAGER, P.R.;
Biological Monitoring of Toxic Metals, Plenum Press, New York, 1988. p.199-245.
- DIAS, J.C.A.; VICENTE, A.C.P.; HOFER, E.; Coliformes Fecais em Águas de Esgoto. Resistência a Antibióticos, Metais e Colicinogenia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, **82**:335-343, 1987.
- DÖBLER, W. Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater. **Appl Microbiol Biotechnol.**, **62**:124-33, 2003.
- ESSA, A.M.M.; MACASKIE, L.E.; BROWN N.L. Mechanisms of mercury bioremediation. **Biochemical Society Transactions**, **30**:672-674, 2002.
- ETO, K. Minamata Disease. **Neuropathology** **20**:14-19, 2000.
- EYSINK, G.G.J.; PADUA, H.B. & MARTINS, M.C. Presença do Mercúrio. **Ambiente**, **2**:43-50, 1988.
- FERREIRA, H.P.; FILHOTE, M.I.F.; HAIKEL, S.; NORONHA, C.; CARVALHO, T.A. Monitoramento dos Riscos e Efeitos à Saúde de Agentes Comunitários Expostos Ocupacionalmente aos Organofosforados: Estudo Ocupacional, Clínico e Neurológico. **Cadernos de Saúde Coletiva**, **8**:23-38, 2001.

- FERREIRA, R.C.H.; APPEL, L.E. Fontes e Usos de Mercúrio no Brasil. Rio de Janeiro: CETEM/ CNPq, (**Estudos e Documentos, 13**) 1991. 32p.
- FIGUEIREDO, B.R.; **Minérios e Ambiente**. Campinas, SP: UNICAMP, 2000. p334.
- FOSTER, T.J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. **Microbiol. Rev.**, **47**:361-409, 1983.
- FOSTER, T.J. The genetics and biochemistry of mercury resistance. **Crit. Rev. Microbiol.**, **15**:117-140, Review, 1987.
- GALVÃO, L.A.C.; COREY, G.; **Mercurio**. Mepetec, México: ECO, (Serie Vigilancia, 4) 1987. 69p.
- GHOSH, S.; SADHUKHAN, P.C.; GHOSH, D.K.; CHAUDHURI, J.; MANDAL, A. Volatilization of Mercury by resting mercury-resistant bacterial cells. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, **56**:259-264, 1996.
- GOMES, N.C.M.; HAGLER, L.C.S.M.; SAVVAIDIS, I. Metal Bioremediation by Microorganisms. **Revista de Microbiologia**, **28**:85-92, 1998.
- HAMDY, M.K.; NOYES, O.R. Formation of Methyl Mercury by Bacteria. **Appl. Microbiol.**, **30**:424-32, 1975.

- HAMLETT, N.V.; LANDALE, E.C.; DAVIS, B.H.; SUMMERS, A.O.
Roles of the Tn21 merT, merP, and merC Gene Products in
Mercury Resistance and Mercury Binding. **Journal of
Bacteriology.**, **174**:6377-6385, 1992.
- HARADA, M. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning in Japan
Caused by Environmental Pollution. **Crit. Rev. Toxicol.**,
25:1-24, 1995.
- HOBMAN, J.L.; ESSA, A.M.M.; BROWN, N.L. Mercury resistance
(mer) operons in enterobacteria. **Biochemical Society
Transactions**, **30**:719-722, 2002.
- HYLANDER L.D.; MEILI M. 500 Years of Mercury Production:
Global Annual Inventory by Region Until 2000 and
Associated Emissions. **Sci. Total. Environ.**, **304**:13-27,
2003.
- JESUS, I; SANTOS, E.C.; BRABO, E.S.; LOUREIRO, E.C.B.;
CÂMARA, V.M.; MASCARENHAS, A.F.S.; SILVA, D.F.L.; CLEARY,
D. Exposure to Elemental Mercury in Urban Workers and
Gold Miners from the Tapajós Region, Pará, Brazil. **Bull.
Environ. Contam. Toxicol.**, **67**:317-323, 2001.
- LARINI, L. **Toxicologia**; 3.ed. São Paulo: Manole, 1997.
- LACERDA, L.D. Distribuição e Comportamento do Mercúrio no
Ambiente Amazônico. In: Seminário Riscos e Consequências

- do Uso do Mercúrio, 1, 1989, Brasília. **Anais. Rio de Janeiro**: FINEP, 1990. p.80-90
- LIEBERT C.A.; HALL, R.M.; SUMMERS A.O. Transposon Tn21, Flaship of the Floating Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 63:507-522, 1999.
- LIEBERT, C.A.; WIREMAN, J.; TRACY, S.; SUMMERS, A.O. Phylogeny of Mercury resistance (*mer*) operons of gram-negative bacteria isolated from the fecal flora of primates. **Applied and Environmental Microbiology**, 63:1066-1076, 1997.
- LISBOA, P.L.B. Caxiuanã Belém: Museu Emílio Goeldi, 1997. 446p.
- LSMS. Legislação da Segurança e Medicina do Trabalho. 2.ed. São Paulo: LTR, 1992.
- MANDIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.; **Brock Biology of Microorganisms**. New Jersey: Prentice Hall, 1997.
- MALM, O.; PFEIFFER, W.C.; SOUZA, C.M.M. REUTHER, R. Mercury Pollution Due to Gold Mining in the Madeira River Basin Brazil. **Ambio**, n.19, 1990.
- MASCARENHAS, A.F.S.; BRABO, E.S.; JESUS, I.M.; FAIAL, K.F.; MIRANDA, A.M.M.; FERREIRA, H.P.; SÁ, L.L.C.; SÁ FILHO, G.C.; CÂMARA, V.M.; SILVEIRA, I.M., HIGUCHI, H. Mercúrio na Floresta Nacional de Caxiuanã, Estação

- Científica Ferreira Penna-ECFPN, Município de Melgaço, Pará. *In* Anais XLI Congresso Brasileiro de Geologia, 2002.
- MILLER, S.M. Bacterial detoxification of Hg (II) and organomercurials. **Essays Biochem.**, **34**:17-30, 1999.
- MOREIRA, J.C.; PIVETTA, F. Human and Environmental contamination by mercury from industrial uses in Brazil. **Water, Air and Soil Pollution**, **97**:241-246, 1997.
- MOORE, B.A New Screen Test and Selective Medium for the Rapid Detection of Epidemic Strains of *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, **2**:453-458, 1960.
- MOORE, J.W.; RAMAMOORTHY, S. Mercury In: **Heavy metals in Natural Waters** - Applied Monitoring and Impact Assessment. Springer-Verlag, 1984. p. 125-160.
- MUKHOPADHYAY, D.; YU, H.; NUCIFORA, G.; MISRA, T.K. Purification and Functional Characterization of MerD A Coregulator of the Mercury Resistance Operon in Gram-negative Bacteria. **The Journal of Biological Chemistry**, **266**:18538-18542, 1991.
- NAKAMURA, K.; AOKI, J.; MORISHITA, K.; YAMAMOTO, M. Mercury volatilization by the most mercury-resistant bacteria from the seawater of Minamata Bay in various physiological conditions. **Clean Products and Processes**, **2**:174-178, 2000.

- NAKAMURA, K.; FUJISAKI, T.; SHIBATA, Y. Mercury-Resistant Bacteria in the Sediment of Minamata. **Nippon Suisan Gakkaishi**, **54**:1359-1363, 1988.
- NAKAMURA, K., FUJISAKI, T.; TAMASHIRO, H. Characteristics of Hg-Resistant Bacteria Isolated from Minamata Bay Sediment. **Environmental Research**, **40**:58-67, 1986.
- NAKAMURA, K.; IWAHARA, M.; FURUKAWA, K. Screening of organomercurial-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediments and seawater of Minamata Bay in Japan. **Clean Products and Processes**, **3**:104-107, 2001.
- NAKAMURA, K.; SAKATA, T.; NAKAHARA, H. Volatilization of Mercury Compounds by Methylmercury-Volatilizing Bacteria in Minamata Bay Sediment. **Environmental Contamination and Toxicology**, **4**:651-656, 1988.
- NASCIMENTO, A.M.A.; SOUZA, E.C. Operon *mer*: Bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments. **Genetics and Molecular Research**, **2**:92-101, 2003.
- OGA, S.; **Fundamentos de Toxicologia**, Atheneu ed., SP, 1996. 169p.
- PADBERG, S.; Exemples of Mercury transport systems-aquatic system and terrestrial system. In: GUIMARÃES, G. A.; SILVA, A.R.B.; DUTRA, M.S. (org.) **Contaminação Mercurial**:

- Homem Versus Meio Ambiente nos Garimpos da Amazônia. Belém: UNAMAZ, (Série Cooperação Amazônica, 12) 1994. 388p.
- RAVINA, D.M.; BAATH E. Development of Metal Tolerance in Soil Bacterial communities Exposed to Experimentally Increased Metal Levels. **Applied and Environmental Microbiology**, **62**:2970-2977, 1996.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Lab Press, New York, 1989.
- SANTOS, E.C.O. Enquêtes sanitaites et contaminations mercurielles em Amazonie brésiliene In: CARMOUZE, J; LUCOTTE, M.; BOUDOU, A. Coord.). **Le mercure em Amazonie**. Paris: Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 2001. p.347-372.
- SANTOS, E.C.O.; JESUS, I.M.; BRABO, E.S.; LOUREIRO, E.C.B.; SA FILHO, G.C.; MASCARENHAS, A.F.; FAIAL, K.F.; LIMA, M.O.; SILVA, A.P.; CÂMARA, V.M. Poluição por mercúrio e Saúde Humana no Vale do Tapajós. In: VILLAS-BÔAS, R.C; BEINHOFF, C.; SILVA, A.R. (Ed.). **Mercuy in the Tapajós Basin**. Rio de Janeiro: CNPq; Ciência y tecnologia para el Desarrollo (CYTED), 2001. p.137-157.

- SANTOS, E.C.O.; LOUREIRO, E.C.B.; JESUS, I.M.; BRABO, E.S.; SILVA, R.S.U.; SOARES, M.C.P.; CÂMARA, V.M.; SOUZA, M.R.S.; BRANCHES, F. Diagnóstico das condições de saúde de uma comunidade garimpeira na região do Rio Tapajós, Itaituba, Pará, Brasil, 1992. **Cad. Saúde Públ.**, **11**:212-225, 1995.
- SANTOS, E.C.O.; JESUS, I.M.; BRABO, E.S.; CÂMARA, V.M.; LOUREIRO, E.C.B.; SILVA, D.F.L.; SOUZA, M.R.S.; BRANCHES, F.; CLEARY, D. Estudo de saúde e exposição ao mercúrio da comunidade ribeirinha de Brasília Legal, Estado do Pará, Brasil. **Cad. Saúde Colet.**, **7**:131-146, 1999.
- SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações Agudas** 3. ed. São Paulo: Sarvier, (Monografias Médicas. Série Pediátrica, 3) 1985. 260p.
- SILVA, A.R.B.; GUIMARÃES, G.A.; COSTA, M.Q.; SOUZA, T.M.C. A contaminação mercurial nos garimpos de ouro da Amazônia. *In*: GUIMARÃES, G.A.; SILVA, A.R.B.; DUTRA, M.S. (org.) **Contaminação Mercurial: Homem Versus Meio Ambiente nos Garimpos da Amazônia**. Belém: UNAMAZ, (Série Cooperação Amazônica, 12) 1994. p.51-90.
- SILVA, P.S. As diversas formas de garimpo de ouro, suas emissões de mercúrio e mecanismo de dispersão nos diversos compartimentos ambientais. *In*: MATHIS, A.; REHAAG, R.

- (org.) **Conseqüências da garimpagem no âmbito social e ambiental da Amazônia.**, 1993. p.48-53.
- SILVER, S.; PHUNG, LE T. Bacterial heavy metal resistance: New surprises. **Annu. Ver. Microbiol.**, **50**:753-89, 1996.
- SILVER, S.; WALDERHAUG, M. Gene regulation of plasmid and cromossomal determined inorganic ion transport in bacteria. **Microbiol. Rev.**, **56**:195-228, 1992.
- SMITH, T.; PITTS, K.; MCGARVEY, J.A.; SUMMERS, A.O. Bacterial Oxidation of Mercury Metal vapor, Hg (0). **64**:1328-1332, 1998.
- STARNBACH, M.N., FALKOW, S., TOMPKINS, L.S. Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hibridization. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**:1257-1261, 1989.
- TAKIZAWA, Y. Studies on the Niigata episode of Minamata disease outbreak. Investigation of causative agents of organic mercury poisoning in the district along the river Agano. **Acta Med Biol (Niigata)**, **17**:293-297, 1970.
- TONOMURA, K.; MAEDA K.; FUTAI, K.; NAKAGAMI, T.; YAMADA, M. Stimulative Vaporization of Phenyl-mercuric Acetate by Mercuric-resistant Bacteria. **Nature**, 217:644-646, 1968.
- TREVORS, J.T.; Mercury Methylation by Bacteria. **J. Basic Microbiol.**, **26**:499-504, 1986.