



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL
E MEIO AMBIENTE**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO MERCÚRIO A
PARTIR DO GENE *merA* NA BACIA DO RIO MADEIRA**

ADRIELY FERREIRA DA COSTA NERY

Porto Velho – RO
2021

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO REGIONAL
E MEIO AMBIENTE**

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO MERCÚRIO A
PARTIR DO GENE *merA* NA BACIA DO RIO MADEIRA**

ADRIELY FERREIRA DA COSTA NERY

Orientador: Dr. Wanderley Rodrigues
Bastos

Coorientador: Dra. Najla Benevides Matos

Dissertação de mestrado apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente da Fundação Universidade Federal de Rondônia – UNIR, como pré-requisito, para obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente.

Linha de pesquisa: L1 – Ambiente, Saúde e Sustentabilidade.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Fundação Universidade Federal de Rondônia
Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo(a) autor(a)

N456b Nery, Adriely Ferreira da Costa .

Bioprospecção de bactérias resistentes ao mercúrio a partir do Gene Mera na Bacia do Rio Madeira / Adriely Ferreira da Costa Nery. -- Porto Velho, RO, 2021.

62 f.

Orientador(a): Prof. Dr. Wanderley Rodrigues Bastos

Coorientador(a): Prof.^a Dra. Najla Benevides Matos.

Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1.mercúrio. 2.resistência. 3.bactérias. 4.região Amazônica. 5.água; sedimento. I. Bastos, Wanderley Rodrigues. II. Título.

CDU 504.5(811)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Rondônia, UNIR, instituição a qual fiz parte desde a graduação, e que proporcionou mais uma conquista em minha formação acadêmica.

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

Ao Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, PGDRA, e a todos os professores pelo suporte em minha formação.

Ao professor Wanderley Bastos, por todo conhecimento transmitido a mim, pela oportunidade e confiança, sempre orientando no que fosse preciso.

À professora Najla Benevides Matos, pela paciência, atenção e confiança em mim depositados.

À professora Adriana Nunes e à Marília Mussy, componentes da banca examinadora, pela gentileza e disposição em ler, comentar, e propor sugestões para melhorias no trabalho.

Aos meus pais Maria Janilce e Nelcy, pelo amor, dedicação e apoio incondicionais, sempre acreditando em mim e me incentivando em minhas decisões.

À minha irmã Aline, que mesmo estando à distância nestes últimos dois anos, torceu e acreditou em meu êxito. Sempre foi uma irmã-amiga, dedicada e preocupada com sua irmã mais nova.

Aos meus familiares, que me viram crescer e que me apoiaram em minha caminhada.

Ao meu noivo Murylo, por ser tão amigo e dedicado, pelo amor e incentivo. Pela contribuição valiosa nos ajustes com o mapa e nas análises estatísticas.

Aos colegas do CEPEM, Anjo Gabriel que me auxiliou enormemente no processo experimental e Nucia Cristiane, que sempre que podia também auxiliava, além das boas conversas.

Aos colegas do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental por me acompanharem nessa caminhada.

ADRIELY FERREIRA DA COSTA NERY

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO MERCÚRIO A
PARTIR DO GENE *merA* NA BACIA DO RIO MADEIRA**

Comissão Examinadora

Documento assinado eletronicamente por **WANDERLEY RODRIGUES BASTOS, Presidente**, em 18/03/2021, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **MARILIA HIGINO MUSSY, Membro Titular**, em 18/03/2021, às 14:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA CRISTINA DA SILVA NUNES, Membro Titular**, em 18/03/2021, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **ADRIELY FERREIRA DA COSTA NERY, Discente**, em 18/03/2021, às 19:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Porto Velho, 18 de março de 2021.

Resultado: Aprovada.

RESUMO

O mercúrio (Hg) é um metal que tem destaque por seu potencial toxicológico, visto que a ação desse elemento pode levar a alterações nos sistemas de transporte intracelulares dos organismos, bem como afetar negativamente o funcionamento do sistema nervoso. A região Amazônica, na década de 80, foi palco de grandes atividades garimpeiras de ouro, que ainda hoje persiste, em menor escala, com destaque à bacia do Rio Madeira, no estado de Rondônia, contribuindo consideravelmente para a contaminação do ecossistema local. Apesar do histórico dos garimpos de ouro ao longo dos anos esse não é o único ponto que chama a atenção quanto a emissão do Hg na região Amazônica, visto que a mesma possui solos naturalmente ricos em Hg, além disso a queima de grandes áreas florestais resulta na liberação do metal podendo chegar aos sistemas aquáticos. Outro fator que pode contribuir para que essas emissões aconteçam é a criação de ambientes lênticos com a construção de barragens para a geração de energia elétrica, atividade essa que vem acontecendo de forma cada vez mais intensa na Amazônia. Apesar da toxicidade, tanto para células eucariontes, quanto para procariontes, ambientes contaminados acabam por selecionar microrganismos resistentes, com mecanismos adaptativos de redução enzimática de espécies mercuriais. Desta forma, a bioprospecção de microrganismos que possam ser utilizados na biorremediação de ecossistemas contaminados constitui-se como o passo inicial em pesquisas que visem transformar compostos tóxicos em compostos menos nocivos. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a resistência de bactérias ao Hg a partir do gene *merA*. As bactérias foram isoladas de amostras de água de superfície e fundo, e sedimento de fundo de um trecho da bacia do Rio Madeira. Os isolados obtidos foram avaliados quanto às concentrações, de HgCl_2 , capazes de inibir seu crescimento, além da detecção do gene de resistência *merA*, responsável pela redução enzimática do Hg^{2+} para Hg^0 , por meio de PCR convencional. No estudo foram isoladas 79 colônias bacterianas das quais 18 apresentaram tolerância, ao Hg, acima $20 \mu\text{M}$. Os 18 isolados, com maior tolerância, foram submetidos à PCR e identificados quanto às espécies. Destes pôde ser constatada a presença do gene *merA* em 4 isolados, demonstrando a resistência dessas cepas por via genética. Para a identificação, das espécies bacterianas resistentes, foi realizado o sequenciamento da região 16S rRNA. Dos microrganismos resistentes, identificados no sequenciamento, 2 pertenciam à espécie *Acinetobacter nosocomialis*, 1 à *Serratia marcescens*, e 1 à *Klebsiella quasipneumoniae*, evidenciando a predominância de isolados Gram-negativos quanto à tolerância/resistência ao Hg. De acordo com os resultados obtidos, neste trabalho, foi possível observar que bactérias isoladas de sedimento de fundo apresentaram maiores níveis de tolerância, em relação às isoladas da água, salientando a relação dos diferentes níveis de tolerância com o local de origem das cepas avaliadas. Bactérias prospectadas na região Amazônica possuem potencial de utilização em futuros estudos para a aplicação na biorremediação do Hg, visto que revelaram, ser resistentes ao metal devido a presença do gene *merA*.

Palavras-chave: mercúrio, resistência, bactérias, região Amazônica, água, sedimento.

ABSTRACT

Mercury (Hg) is a metal that stands out for its toxicological potential, since the action of this element can lead to changes in the organism's intracellular transport systems, as well as negatively affect the functioning of the nervous system. The Amazon region, in the 1980s, was the scene of great gold mining activities, which still persists, to a lesser extent, with emphasis on the Madeira River basin, in the state of Rondônia, contributing considerably to the contamination of the local ecosystem. Despite the history of gold mining over the years, this is not the only point that draws attention regarding the emission of Hg in the Amazon region, since it has soils naturally rich in Hg, in addition the burning of large forest areas results in the release of the metal can reach the aquatic systems. Another factor that can contribute to these emissions to happen is the creation of lentic environments with the construction of dams for the generation of electric energy, an activity that has been happening more and more intensely in the Amazon. Despite the toxicity, both for eukaryotic cells and prokaryotes, contaminated environments end up selecting resistant microorganisms, with adaptive mechanisms of enzymatic reduction of mercury species. Thus, the bioprospecting of microorganisms that can be used in the bioremediation of contaminated ecosystems constitutes the initial step in research aimed at transforming toxic compounds into less harmful compounds. In this context, the present study aimed to investigate the resistance of bacteria to Hg from the *merA* gene. The bacteria were isolated from surface and bottom water samples, and bottom sediment from a stretch of the Madeira River basin. The obtained isolates were evaluated for concentrations of HgCl₂, capable of inhibiting their growth, in addition to the detection of the *merA* resistance gene, responsible for the enzymatic reduction of Hg²⁺ to Hg⁰, by means of conventional PCR. In the study, 79 bacterial colonies were isolated, of which 18 showed tolerance to Hg above 20 µM. The 18 isolates, with greater tolerance, were submitted to PCR and identified as to the species. Of these, it was possible to verify the presence of the *merA* gene in 4 isolates, demonstrating the resistance of these strains genetically. For the identification of the resistant bacterial species, the sequencing of the 16S rRNA region was performed. Of the resistant microorganisms identified in the sequencing, 2 belonged to the species *Acinetobacter nosocomialis*, 1 to *Serratia marcescens*, and 1 to *Klebsiella quasipneumoniae*, showing the predominance of Gram-negative isolates in terms of tolerance/resistance to Hg. According to the results obtained, in this work, it was possible to observe that bacteria isolated from bottom sediment had higher levels of tolerance, compared to those isolated from water, highlighting the relationship of the different levels of tolerance with the place of origin of the strains evaluated. Bacteria prospected in the Amazon region have the potential to be used in future studies for the application in the bioremediation of Hg, since they have shown to be resistant to metal due to the presence of the *merA* gene.

Keywords: mercury, resistance, bacteria, Amazon region, water, sediment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo do mercúrio em sistemas aquáticos e terrestres.....	15
Figura 2 – Esquema de representação do mecanismo de redução pelo operon <i>mer</i>	23
Figura 3 – Área de amostragem com os pontos de coleta evidenciados no Rio Madeira.....	28
Figura 4 – Coleta de água de fundo para cultura bacteriana.....	29
Figura 5 – Draga de Van Veen para amostragem de sedimento de fundo.....	30
Figura 6 – Coleta de sedimento de fundo para cultura bacteriana.....	30
Figura 7 – Boxplots referentes aos resultados sazonais de a) condutividade elétrica e b) pH, do sistema Madeira.....	35
Figura 8 – Gráficos referentes aos resultados de a) condutividade elétrica e b) pH do Igarapé Ceará.....	35
Figura 9 – Boxplots referentes aos resultados sazonais de a) oxigênio dissolvido e b) turbidez, do sistema Madeira.....	37
Figura 10 – Gráficos referentes aos resultados de a) oxigênio dissolvido e b) turbidez do Igarapé Ceará.....	37
Figura 11 – Concentrações de HgT por ponto amostral na matriz água.....	39
Figura 12 – Concentrações de HgT por ponto amostral na matriz sedimento de fundo.....	40
Figura 13 – Número de isolados, com crescimento no teste de MIC, por ponto amostral.....	44
Figura 14 – Amplificação do fragmento <i>merA</i> de resistência ao Hg.....	47

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Pontos de coleta com suas respectivas coordenadas geográficas.....	28
Quadro 2 – MIC dos isolados prospectados por matriz.....	45
Quadro 3 – Isolados identificados pelo sequenciamento da região 16S rRNA.....	49
Tabela 1 – Número de isolados prospectados, na matriz água, por ponto amostral e nas duas diferentes concentrações de HgCl ₂	42
Tabela 2 – Número de isolados prospectados, na matriz sedimento, por ponto amostral e nas duas diferentes concentrações de HgCl ₂	43

LISTA DE ABREVIATURAS

BrCAST – Brazilian Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing	Ca – Cálcio
°C – Grau Celsius	C ₆ H ₅ Hg ¹ – Fenilmercúrio
CH ₃ – Metil	CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
CH ₄ – Metano	HgT – Mercúrio total
CH ₃ Hg ⁺ – Metilmercúrio	IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CO ₂ – Dióxido de carbono	µg. g ⁻¹ – Micrograma por grama
CEPEM – Centro de Pesquisa em Medicina Tropical	mg. L ⁻¹ – Miligrama por litro
DO – Densidade óptica	MIC – Minimum Inhibitory Concentration
EPA – Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)	ng. g ⁻¹ – Nanograma por grama
H ₂ O ₂ – Peróxido de hidrogênio	pb – pares de base
HClO – Ácido hipocloroso	PCR – Polymerase Chain Reaction
Hg – Mercúrio	pH – potencial Hidrogeniônico
Hg ⁰ – Mercúrio elementar	rRNA – ribossomal Ribonucleic Acid
[(CH ₃) ₂ Hg] – Dimetilmercúrio	
HgCl ₂ – Cloreto mercúrico	
HgS – Sulfeto de mercúrio	
Hg ²⁺ – Mercúrio iônico	
HSO ₃ – Íon hidrogenossulfito	
NaCl – Cloreto de sódio	
µg. L ⁻¹ – Micrograma por litro	
µg. kg ⁻¹ – Micrograma por kilo	
µM – Micromolar	
Mm – Milimolar	
ng. mL ⁻¹ – Nanograma por mililitro	
LB – Luria Bertani	
OH – Hidroxila	
OMS – Organização Mundial da Saúde	
PA – Pará	
ppm – parte por milhão	
Pt – Promotor de genes estruturais	
Pr – Promotor próprio	
PVC – Policloreto de vinila	
SO ₃ – Trióxido de enxofre	
RNA – Ribonucleic Acid	
UHE-SAE – Usina Hidrelétrica de Santo Antônio	
U – Unidade	
UNIR – Unversidade Federal de Rondônia	
V – Volts	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 O MERCÚRIO NO AMBIENTE.....	13
2.2 TOXICOLOGIA DO MERCÚRIO	17
2.3 O PAPEL DOS MICRORGANISMOS NA TRANSFORMAÇÃO DO MERCÚRIO.....	19
2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AO MERCÚRIO.....	20
2.5 REDUÇÃO ENZIMÁTICA E O OPERON <i>mer</i>	21
2.6 A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOLOGIA AMBIENTAL PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA AMAZÔNIA.....	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 OBJETIVO GERAL.....	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 ÁREA DE AMOSTRAGEM.....	27
4.2 AMOSTRAS DE ÁGUA	29
4.3 AMOSTRAS DE SEDIMENTO DE FUNDO.....	29
4.4 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	30
4.5 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE HgT NAS ÁGUAS E SEDIMENTOS DE FUNDO.....	31
4.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO HG POR ENRIQUECIMENTO.....	31
4.7 TESTE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC).....	32
4.8 IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>merA</i> POR PCR CONVENCIONAL.....	32
4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS TOLERANTES/RESISTENTES POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S RNA.....	33
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA.....	34
5.1.1 Condutividade elétrica e pH.....	34
5.1.2 Oxigênio dissolvido e turbidez.....	36
5.2 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE HgT NAS ÁGUAS E SEDIMENTOS DE FUNDO.....	38
5.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO Hg.....	41
5.4 TESTE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA.....	43
5.5 IDENTIFICAÇÃO DO GENE <i>merA</i>	46
5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS TOLERANTES/RESISTENTES.....	48
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

O mercúrio (Hg) é um metal amplamente utilizado na indústria, na agricultura e principalmente no garimpo de ouro, sendo um dos metais mais tóxicos, ocorrendo naturalmente no ambiente em diferentes espécies químicas (GIOVANELLA et al., 2011).

O Hg pode ser classificado em três grandes espécies químicas: Voláteis, como o Mercúrio elementar (Hg^0) e o dimetilmercúrio [$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$]; Muito Reativas, a exemplo do Íon mercúrico (Hg^{2+}) e o cloreto mercúrico (HgCl_2); e as Espécies químicas Pouco Reativas, como o sulfeto de mercúrio (HgS) e o Metilmercúrio (CH_3Hg^+) (BARROCAS, 2003).

Na região Amazônica, a corrida pela exploração de ouro na década de 1980 tornou o problema da contaminação por Hg bastante conhecida pela comunidade internacional. Cerca de 30% do Hg utilizado na formação de amálgamas com o ouro eram perdidos durante o processo, levando à contaminação dos corpos d'água (MALM et al., 1990). Atualmente não se sabe ao certo o quantitativo dessas emissões, entretanto elas ainda continuam em menor escala (LACERDA; MALM, 2008).

Conhecer a espécie química do Hg é fundamental em nível de toxicidade, contudo, a capacidade de afetar negativamente o funcionamento do sistema nervoso é comum em todas elas (CLARKSON, 2002). Além disso, os sistemas de transporte intracelulares podem ser alterados pela ação do Hg (OSBORN et al., 1997; NIES, 1999).

As formas orgânicas desse elemento são acumuladas em tecidos de organismos, e conseqüentemente transferidas para níveis superiores da cadeia trófica com grande eficiência (MASON et al., 1996; BISINOTI; JARDIM, 2004; BRABO, 2010). A sua forma catiônica, Hg^{2+} é considerada altamente nociva devido à capacidade de ligar-se a grupos sulfidríla, tioéter e imidazol, componentes de enzimas e proteínas, tornando-as inativas (HORN et al., 1994; GUPTA; ALI, 2004). O Hg^{2+} pode sofrer o processo de metilação e desmetilação na interface água-sedimento, no sedimento ou na coluna de água (ZHANG; PLANAS, 1994; MIRANDA et al., 2007), podendo ser degradado a partir de mecanismos fotoquímicos ou por atividades enzimáticas bacterianas (MOREL et al., 1998; BARKAY et al., 2003; SILVER; HOBMAN, 2007).

A remoção de metais pesados do citoplasma, pelos microrganismos, normalmente ocorre por efluxo. Quando o contaminante é o Hg, os microrganismos

utilizam o operon¹ *mer*, este é um sistema genético constituído por genes estruturais codificantes de proteínas reguladoras, transportadoras e de transformação do Hg (SILVER; HOBMAN, 2007).

Ao longo dos anos foram realizados diversos estudos apresentando os efeitos nocivos do Hg e de seus compostos tanto para humanos quanto para animais. Neste sentido as diversas evidências geraram inúmeras discussões em âmbito político em todo o mundo, o que resultou na elaboração de um tratado internacional juridicamente vinculante, a Convenção de Minamata para o mercúrio, que prevê a futura eliminação do uso deste metal e seus compostos de atividades como o garimpo de ouro, produção e venda de lâmpadas fluorescentes e termômetros com Hg, no uso de amálgamas dentários e outras, que ainda hoje o utilizam (UNEP, 2019). A Convenção teve seu texto final aprovado em 2013 e conta com 128 signatários, entre eles o Brasil, que passou a entrar em vigor, no país, em agosto de 2018.

O artigo 12, parágrafo 4 do Decreto nº9.470, de 14 de agosto de 2018, que promulga a Convenção de Minamata sobre o Mercúrio, o qual se refere às áreas contaminadas, encoraja as partes no desenvolvimento de estratégias e na implementação de atividades que visem identificar, avaliar, priorizar, gerir e, conforme apropriado, remediar áreas contaminadas.

A utilização de técnicas físico-químicas convencionais, como forma de remediação de ambientes contaminados, com cátions metálicos tóxicos, se mostram ineficientes, possuem alto custo de operação e geralmente produzem resíduos contaminantes (CAMARGO et al., 2007; NAJA; VOLESKY, 2010). Desta forma as bactérias são alternativas em potencial, sendo mais economicamente viáveis e ecologicamente corretas quando o assunto é a mitigação dos efeitos tóxicos causados pelo mercúrio no ambiente, visto que alguns grupos bacterianos possuem sistemas especializados de resistência aos metais, dentre eles o Hg.

Considerando que a contaminação ambiental por Hg pode acarretar em severos danos à saúde, a proposta deste trabalho justifica-se pela preocupação em se realizar estudos prévios que investiguem bactérias resistentes ao Hg e sua potencial utilização na biorremediação de ecossistemas contaminados. Estudos com este viés, na região

¹ Operon – Conjunto de genes que se encontram funcionalmente relacionados, contíguos e controlados coordenadamente, sendo todos expressos um RNA mensageiro. É constituído pelo promotor, operador e os genes estruturais.

Amazônica, são muito escassos, dificultando a tomada de decisão para a implementação de políticas ambientais voltadas para a recuperação de áreas contaminadas por Hg.

Pensando no exposto acima, o local de coleta selecionado, nesta pesquisa, foi um trecho do alto Rio Madeira, compreendido a partir da confluência do igarapé Caripunás com o Rio Madeira até próximo à Hidrelétrica de Santo Antônio. A escolha do local de coleta foi feita devido ao conhecimento do histórico de lançamento de Hg proveniente das atividades garimpeiras, de ouro, que ainda são incidentes na região, bem como pelas grandes transformações que vem ocorrendo nos últimos anos nessa área, a exemplo da construção de barragens no rio para a geração de energia elétrica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O MERCÚRIO NO AMBIENTE

O Hg está presente na natureza em três formas químicas: mercúrio inorgânico elementar (como vapor ou líquido, não reativo), sais ou minerais inorgânicos, e mercuriais orgânicos. Essas três formas químicas de Hg são transformadas no ambiente, sendo que o contato com todas elas podem gerar toxicidade (UNEP, 2002).

O mercúrio elementar é o único metal que se encontra na forma líquida quando em estado natural. Possui coloração prateada, elevada tensão superficial, e é inodoro (OGA, 1996; BRABO, 2010). No ambiente sua volatilidade aumenta em até oito vezes quando há elevação da temperatura de 25°C a 50°C (LARINI, 1997). Sendo esta forma química menos reativa, comparada às formas iônicas e orgânicas, para sistemas biológicos.

Boa parte do Hg no ambiente foi originada de processos naturais como erupções vulcânicas (GALVÃO; COREY, 1987; NRIAGU; BECKER, 2003). Depósitos de minérios de cinábrio (HgS) e metacinarita são abundantes na superfície terrestre de regiões vulcânicas, apresentando elevadas concentrações de Hg nesses locais (BELLIVEAU; TREVORST, 1989; FIGUEIREDO, 2000). As concentrações de Hg, próximos de fontes potencialmente poluidoras, podem ultrapassar 10 ppm (mgHg.kg⁻¹), enquanto que nas rochas as concentrações variam de acordo com a profundidade as quais se encontram no solo, apresentando teores mais elevados entre 5 a 20 cm da superfície (SILVA et al., 1994; BRABO, 2010).

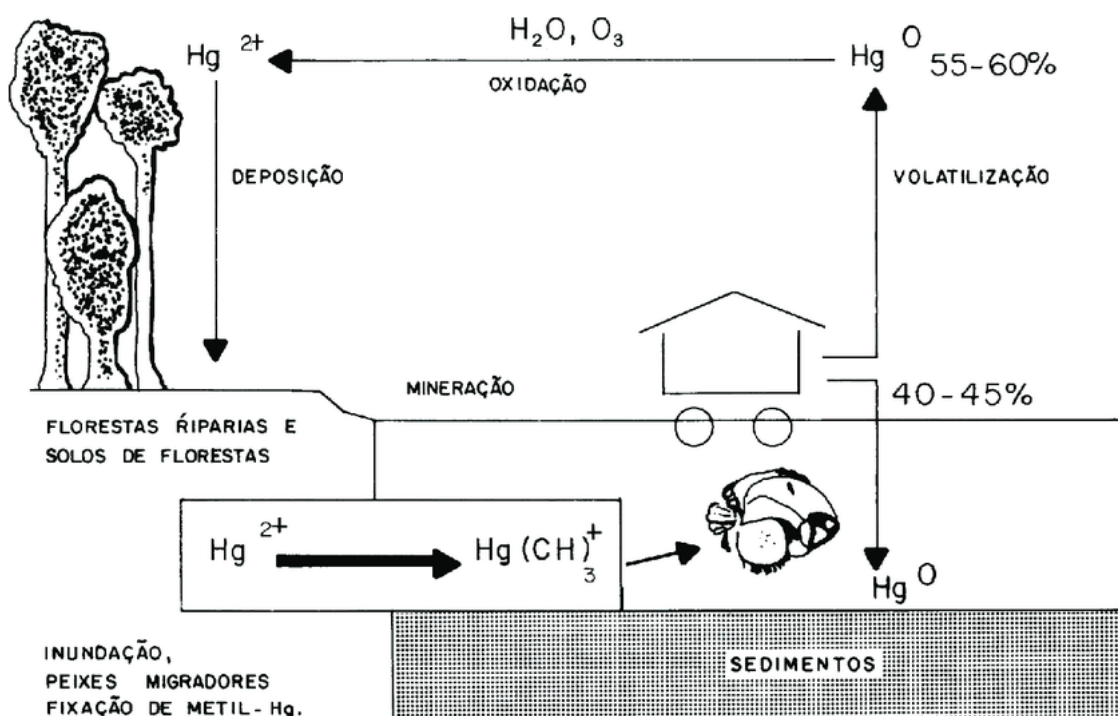
Os solos amazônicos são naturalmente ricos em Hg na sua forma química inorgânica, a presença deste Hg é atribuída à deposição atmosférica ao longo de milhares de anos, sendo que mais de 97% do Hg acumulado na superfície do solo é pré-antropogênico. Embora a origem geológica natural destes altos níveis seja controversa há o reconhecimento de que o ambiente amazônico tem potencial de liberar e acumular quantidades relevantes de Hg em resposta a outros fatores, além da mineração do ouro (NRIAGU et al., 1992; BERZAS NEVADO et al., 2010; ARRIFANO et al., 2018). Um desses fatores é a queima de grandes áreas de florestas, responsável pela liberação do Hg presente na biomassa e solos dessas áreas (BRABO, 2010).

Cerca de 95% do Hg presente na atmosfera está na forma elementar, e a oxidação desta espécie química para Hg^{2+} ocorre de forma lenta, sob a influência de nevoeiros e nuvens com gotículas de água. Possivelmente o ozônio juntamente com o HClO , HSO_3 e OH sejam os oxidantes de maior relevância neste processo. Ainda na atmosfera, o Hg^{2+} produzido, pode ser reduzido a Hg^0 por meio do SO_3 ou pelo processo de foto-redução (MOREL et al., 1998).

Atividades como mineração de prata e ouro, incineração de resíduos urbanos, bem como a queima de combustíveis fósseis contribuem com até 60% das emissões de Hg para a atmosfera, afetando no ciclo global desse elemento (BATTEN; SCOW, 2003).

O transporte e a distribuição do Hg no meio ambiente estão relacionados a dois ciclos (figura 1). O primeiro em âmbito global, que envolve a circulação atmosférica do vapor de Hg proveniente de fontes terrestres para os oceanos. O segundo em âmbito local, que ocorre em função da dispersão de Hg inorgânico (fase vapor e líquida) e sua metilação principalmente de fontes antropogênicas (BOENING, 2000; MIRANDA et al., 2007).

Figura 1 – Ciclo do mercúrio em sistemas aquáticos e terrestres.



Fonte: LACERDA; SALOMONS (1998)

As espécies químicas do Hg exercem influência significativa no seu transporte, visto que, enquanto o mercúrio elementar é capaz de percorrer longas distâncias (na fase de vapor), outras espécies químicas ligam-se ao particulado e se depositam. O Hg na fase de vapor pode permanecer na atmosfera de quatro meses até quatro anos (WHO, 1991; DRISCOLL et al., 2013). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mesmo com a diminuição de atividades antropogênicas do Hg, a emissão do metal ainda continuará acontecendo por meio dos fenômenos naturais de evaporação dos oceanos e desgaseificação natural da crosta terrestre (WHO, 1990). Bem como as re-emissões das deposições ocorridas ao longo dos tempos.

Apesar das emissões de Hg continuarem acontecendo por meio de fenômenos naturais, o texto da Convenção de Minamata prevê que a implementação das obrigações da Convenção levará a uma redução geral dos níveis de Hg no ambiente ao longo do tempo, alcançando, assim, o objetivo de proteger a saúde humana e o meio ambiente das emissões e liberações antropogênicas de Hg e compostos mercuriais (UNEP, 2019).

De acordo com o Artigo 8, parágrafo 7 do texto da Convenção de Minamata sobre o mercúrio, o qual refere-se às emissões, prevê que no prazo máximo de cinco anos após a entrada em vigor da Convenção para si, cada parte deverá estabelecer, um

inventário de emissões de fontes relevantes, que deverá ser mantido a partir de então (UNEP, 2019). No entanto desde a promulgação da Convenção, no Brasil, em agosto de 2018, até o momento o país ainda não possui um levantamento centralizado das fontes e emissões.

O Hg pode ser carregado para o ambiente aquático por meio da erosão, lixiviação e deposição atmosférica, sendo a principal fonte a deposição úmida (chuvas). As espécies químicas do Hg introduzidas no sistema aquático são reguladas por processos físicos, químicos e biológicos que acontecem nas interfaces ar-água e água-sedimento (GRAZZIOTIN, 2015). Dentro desta realidade podemos destacar a bacia do Rio Madeira, cuja, a pecuária extensiva, plantação de soja, mineração de cassiterita e queima de florestas levam à erosão dos solos fazendo com que o Rio Madeira e seus afluentes atuem como principal rota na exportação de Hg para seus sistemas aquáticos associados (LECHLER et al., 2000; GOMES et al. 2006). Cerca de 25% do sedimento armazenado no baixo Rio Amazonas é oriundo do Rio Madeira (FILIZOLA-JUNIOR 1999; LATRUBESSE et al. 2005; ALMEIDA et al., 2014).

Outra atividade que pode contribuir na emissão do Hg é a construção de barragens, que criam ecossistemas lênticos sofrendo inundações constantes. Nos períodos chuvosos na Amazônia, quando os rios transbordam invadindo as florestas, as águas ricas em matéria orgânica em decomposição misturam-se com a matéria orgânica recente. Com o passar do tempo e a ação da luz solar, estes compostos formam peróxido de hidrogênio (H_2O_2), potencializando a liberação do Hg inorgânico que estava no solo. Com o auxílio de bactérias anaeróbicas a partir de processos bioquímicos, o Hg^{2+} é convertido à sua forma orgânica, o metilmercúrio, ficando assim biodisponível na cadeia trófica (ARRIFANO et al. 2018).

Fatores como: temperatura, turbidez da água, teor de fósforo, argila, carbono, enxofre e ferro influenciam na distribuição e biodisponibilidade do Hg em ambientes aquáticos. Em compartimentos aquáticos aeróbicos os complexos solúveis de Hg estão adsorvidos ao sedimento, no entanto, quando em anaerobiose os compostos de Hg precipitados são transformados em uma forma altamente estável, o HgS (Sulfeto de mercúrio), impossibilitando sua reciclagem (UNEP, 2002). A espécie química do Hg predominante nesses ambientes é a Hg^{2+} , que por processos bióticos e abióticos podem ser reduzidos a Hg^0 , ou transformados em H_3C-Hg^+ . O Hg iônico pode ser encontrado, em águas superficiais, complexado aos íons cloreto e hidróxido, como por exemplo: Hg

(OH⁻), HgCl₂ (Cloreto de mercúrio), bem como parte deste Hg pode estar ligada a sulfetos e ácidos húmicos (MOREL et al., 1998).

Substâncias húmicas, em águas anóxicas, especialmente em águas que apresentam pH em torno de 4,5 e ausência de íons cloreto, podem ser fatores determinantes para o processo de redução do Hg (MOREL et al., 1998; LI et al., 2009).

No estudo de Bastos et al. (2020) ao realizarem uma análise espacial e temporal, da distribuição do Hg, na bacia do Rio Madeira e a possível influência da construção de uma usina hidrelétrica a fio d'água foi possível verificar que apesar de a construção do reservatório ter alterado drasticamente os pulsos de inundação, na área de estudo, além de impactar nas cargas de material particulado em suspensão, não foi possível verificar impactos nos níveis de Hg e de MeHg. Já que a linha do tempo de estudo pode ainda ser curta para serem verificadas possíveis mudanças nesses níveis.

2.2 TOXICOLOGIA DO MERCÚRIO

Entre 6 milhões de substâncias tóxicas conhecidas o Hg é o sexto elemento tóxico de maior abundância (JAN et al., 2016). Possui a característica de acumular e persistir na natureza, por isso é considerado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA), como um dos elementos mais tóxicos.

Considerado a forma química menos tóxica ao organismo, o mercúrio elementar é pouco absorvido pelo sistema gastrointestinal sendo eliminado em quase sua totalidade, por isso sua ingestão é tida como sem consequências (BARKAY et al., 2003). Contudo, vapores mercuriais, ao serem inalados atravessam a membrana alveolar e consequentemente atingem a circulação sanguínea, na circulação transpõem membranas celulares afetando principalmente o cérebro (NASCIMENTO; CHASIN, 2001). A exposição a vapores de Hg pode levar a inúmeras alterações psíquicas como insônia, depressão, ansiedade, tristeza, irritabilidade, dificuldade para concentração, perda do apetite, embotamento intelectual, indecisão e fobias (COSTA et al., 2017).

Um estudo realizado por Malm et al. (1995), em diferentes cidades da região amazônica, sobre a exposição ocupacional ao Hg por trabalhadores de lojas de compra e venda de ouro, demonstrou que o nível médio de Hg na urina desses trabalhadores foi de 269,42 ng. mL⁻¹. Sendo que o nível máximo aceito, de Hg na urina, é de 50 ng.mL⁻¹ (WHO, 1991). Neste mesmo estudo foi identificado que alguns trabalhadores

apresentavam sintomas típicos como tonturas, dor de cabeça, palpitações, tremores, prurido e insônia.

Entre as propriedades químicas mais importantes do Hg destacam-se a alta afinidade desse metal com o enxofre e a facilidade de formar ligações covalentes com este elemento. Quando há presença do enxofre, em proteínas como grupo sulfidrílica, o átomo de hidrogênio é substituído pelo Hg formando mercaptanas². Deste modo, o Hg interfere no metabolismo e nas funções celulares, mesmo em baixas concentrações no organismo, (VERBEL; RESTREPO, 2002).

Os compostos orgânicos contendo Hg são os que mais despertam a atenção, especialmente o metilmercúrio, considerado a forma química mais tóxica, sendo responsável pelos maiores danos à saúde humana. A toxicidade dos compostos organomercuriais é devida a sua alta estabilidade química, solubilidade em lipídeos, afinidade por proteínas, excreção lenta e facilidade de absorção pelo trato gastrointestinal (KERPER, 1992; VERBEL; RESTREPO, 2002).

O sistema nervoso central é alvo crítico, quando falamos de compostos organomercuriais, visto que o metilmercúrio acomete regiões específicas do cérebro, como lobos temporais e cerebelo. Sendo os principais sintomas de intoxicação por metilmercúrio, problema na articulação das palavras, ataxia, perda da sensibilidade das mãos, pés e em torno da boca, constrição do campo visual, e em estágios avançados de contaminação, podem levar ao coma e à morte (CLARCKSON, 2002). O Hg em sua forma orgânica é acumulado em tecidos de organismos, sendo transferido, de forma eficiente, para os níveis superiores da cadeia trófica (MASON et al., 1996; KEHRIG et al., 2011).

A ingestão de alimentos contendo compostos organomercuriais são do ponto de vista toxicológico, as que representam maior risco de intoxicação da população ribeirinha (BASTOS; LACERDA, 2004). Já o Hg metálico na fase de vapor, se mostra um risco toxicológico ocupacional, por ser absorvido em quase sua totalidade e difundido pelas barreiras hemoencefálica e placentária (KOMYO et al., 1993).

Vieira et al. (2013) ao compararem os níveis de Hg, em amostras de cabelo e de leite, de mães de comunidades ribeirinhas ao longo da bacia do Rio Madeira e de mães da área urbana da cidade de Porto Velho-RO. Verificaram que a concentração média de Hg no cabelo de mães ribeirinhas foi de 8,2 $\mu\text{g. g}^{-1}$ e no leite 2,3 ng. g^{-1} , valores estes,

² Mercaptanas – família de compostos orgânicos de enxofre que contêm um grupo sulfídrico (SH) ligado a um átomo de carbono.

significativamente maiores em relação às mães de Porto velho, que apresentaram concentrações médias de $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ no cabelo, e $0,36 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ no leite. Este estudo demonstra que a exposição ambiental, como o alto consumo de peixe, por essas populações, pode impactar em elevadas concentrações de Hg no organismo.

2.3 O PAPEL DOS MICRORGANISMOS NA TRANSFORMAÇÃO DO MERCÚRIO

As principais transformações que ocorrem no ciclo do Hg são a metilação, desmetilação, oxidação e redução, que acontecem a partir de processos bióticos e abióticos. Na metilação, por via biótica, há a transferência do CH_3 por meio da enzima metiltransferase a partir da metilcobalamina, via acetil-CoA em bactérias redutoras de sulfato (CHOI, et al., 1994). Já no caso da metilação por via abiótica, a metilação é proveniente da interação entre compostos metilados, ácidos fúlvico, húmico e carboxílicos (WEBER, 1993; FALTER, 1999).

A transformação do Hg iônico em metilmercúrio está relacionada a um mecanismo de detoxificação celular bacteriana, visto que o primeiro é menos lipossolúvel que o segundo facilitando assim sua retirada da célula. Tal processo ocorre predominantemente em ambientes anaeróbios podendo ser influenciado por diversos fatores ambientais, sendo eles: temperatura, pH, concentração de bactérias no meio, condições de oxi-redução e tipo de sedimento (OSBORN et al., 1997; BATTEN; SCOW, 2003; NASCIMENTO; CHASIN, 2001; GRÉGOIRE; POULAIN, 2018). Os níveis de metilmercúrio sintetizados biologicamente se devem principalmente pela concentração e forma química do Hg, além das espécies bacterianas e do tamanho da população natural com capacidade de metilar (AZEVEDO, 2003).

Pesquisas realizadas em ambientes dulcícolas e marinhos mostram que a formação do metilmercúrio se dá principalmente pela ação de bactérias sulfato-redutoras, as quais, no processo de respiração, utilizam sulfato como o acceptor final de elétrons, este tem sido associado à metilação do Hg (KING et al., 2002). No entanto, a descoberta de um cluster gênico conhecido como *hgcAB* revelou uma diversidade mais ampla de microrganismos que são potencialmente capazes de metilar o Hg. Como por exemplo microrganismos representantes dos filos Firmicutes e Chloroflexi (SCHAEFER et al., 2014; PODAR et al., 2015; CHRISTENSEN et al., 2016; GRÉGOIRE; POULAIN, 2018).

O metilmercúrio pode ser degradado de duas formas: Por desmetilação redutiva, por ação bacteriana através do gene *merB* (constituente do operon *mer*), ou por desmetilação oxidativa (BARKAY et al., 2003). Na desmetilação oxidativa, ao contrário do que ocorre na redutiva, a desintoxicação do Hg não é realizada por meio de mecanismos específicos. Esse processo metabólico tem como produtos o Hg²⁺ e o CO₂, (OREMLAND et al., 1991; HSU-KIM et al., 2013).

Apesar de a estratégia de desmetilação redutiva, via gene *merB*, estar amplamente relacionada a ambientes aeróbicos, em pesquisa realizada com a bactéria anaeróbia *Geobacter bemidjiensis*, sugere que estratégias similares ao operon *mer* podem estar presentes nesses microrganismos, fornecendo a estes, também, um meio de desmetilação redutiva. O microrganismo do estudo revelou um conjunto de vias de transformação do Hg, incluindo metilação do Hg, redução do Hg²⁺, por meio de um mecanismo semelhante ao *merA* (constituente do operon *mer*), e oxidação do Hg⁰. Tal observação demonstra a importância da investigação dos controles fisiológicos desses microrganismos, já que indicam que as transformações do Hg podem acontecer simultaneamente (LU et al., 2016; GRÉGOIRE; POULAIN, 2018).

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA AO MERCÚRIO

A partir da investigação de cepas clínicas resistentes, a sais de Hg, de *Staphylococcus aureus*, na década de 60, Moore (1960) fez um dos primeiros relatos quanto à resistência bacteriana a metais pesados. Esta resistência se devia à utilização indiscriminada, em hospitais ou pela comunidade, de desinfetantes e fungicidas com compostos mercuriais. Na mesma década, um grupo de pesquisadores, do Japão, isolaram bactérias, oriundas de amostras de solo, e realizaram testes de resistência a diferentes compostos mercuriais. Os isolados testados foram identificados bioquimicamente como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (TONOMURA et al., 1968).

Cada vez mais pesquisas vêm sendo realizadas, a partir destes estudos, com diferentes gêneros bacterianos, no que concerne à resistência a metais. Ao entrarem na célula, metais tóxicos podem interferir no transporte celular, competir com íons que possuem importância fisiológica, além de inativar enzimas vitais (OSBORN et al., 1997). A toxicidade de íons metálicos foi um ponto chave para que no decorrer do processo evolutivo fossem desenvolvidos mecanismos de resistência a metais (NIES, 1999).

Estes mecanismos de resistência têm sido relacionados a plasmídeos e transposons, ou até mesmo como parte do cromossomo principal de alguns gêneros, como é o caso de *Bacillus* (DIAS et al., 1987; RAVINA; BAATH, 1996; SILVER; PHUNG, 1996; HOBMAN et al., 2002).

Diversos metais são essenciais, em baixas concentrações, para o metabolismo de microrganismos atuando como cofatores enzimáticos. Entretanto, o Hg, é considerado um metal não essencial, por não apresentar nenhuma função fisiológica específica, além de ser altamente tóxico tanto para microrganismos, quanto para humanos (CAMARGO et al., 2007).

Ambientes contaminados por Hg têm levado ao crescimento de microrganismos com características adaptativas a partir do desenvolvimento de mecanismos de tolerância e resistência. Este fenômeno está relacionado à grande diversidade genética e metabólica de microrganismos no ambiente, capazes de degradar ou transformar os contaminantes em substâncias inertes (SILVER; PHUNG, 2005). Dentre os mecanismos de resistência e tolerância ao Hg podem se destacar bombas de efluxo, quelação por polímeros enzimáticos, precipitação, biometiliação e redução enzimática (BOENING, 2000). Porém o mecanismo mais estudado, de resistência a esse metal, é o de redução enzimática, por meio do operon *mer* (BARKAY et al., 2003).

A resistência bacteriana ao Hg vem sendo amplamente estudada, sendo descritas duas classes deste mecanismo mediadas por expressão enzimática, são elas: A resistência de espectro limitado, e a resistência de amplo espectro. A resistência de espectro limitado é permissiva a determinados compostos organomercuriais, como o acetado mercúrico de floresceína, e a merbromina, e envolve a redução da forma Hg^{2+} à forma Hg^0 . O sistema de amplo espectro além de ser permissivo aos compostos anteriormente referidos inclui a transformação por redução de outros compostos organomercuriais, entres estes o acetato de fenilmercúrio e o metilmercúrio (SILVER; PHUNG, 1996).

2.5 REDUÇÃO ENZIMÁTICA E O OPERON *mer*

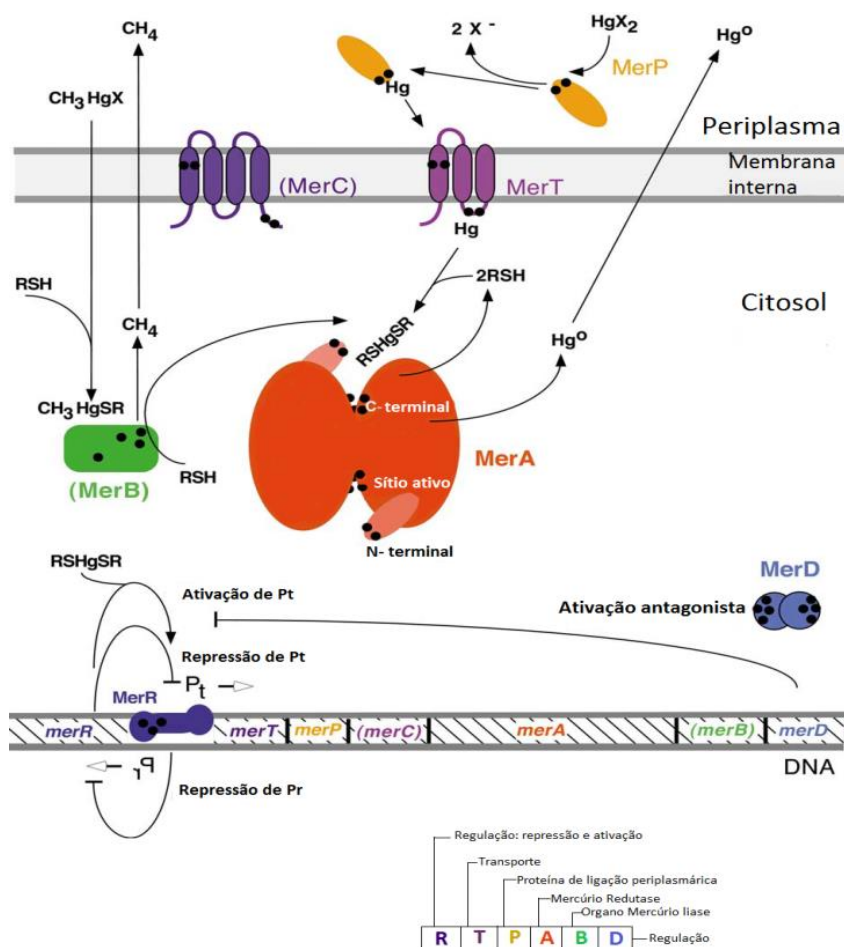
Os genes do operon *mer* podem ser carreados por grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas resistentes ao Hg, esses genes podem fazer parte de plasmídeos, transposons, ou até mesmo do cromossomo bacteriano, sendo que o mecanismo de resistência é semelhante entre esses grupos (TREVORS, 1986). Apesar de serem comumente encontrados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, os genes

que conferem resistência ao Hg possuem diferenças em suas sequências tanto quando comparamos bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quanto bactérias Gram-negativas entre si, da mesma forma acontece para Gram-positivas. Alguns estudos defendem que a resistência bacteriana ao Hg tenha sido um evento anterior à divergência evolutiva que originou bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (HELMANN et al. 1989).

O mecanismo mais estudado de resistência bacteriana, ao Hg, envolve a transformação enzimática a partir de proteínas funcionais codificadas pelo operon *mer*, que é um sistema composto por genes de transporte (*merT*, *merP*), genes de redução do Hg (*merB*, *merA*), e genes de regulação (*merR*, *merD*). Além destes, genes como *merC*, *merE*, *merF* e *merH* codificantes de proteínas de membrana, são considerados como auxiliares em funções de transporte, e *merG* confere resistência ao fenil mercúrio (LIEBERT, et al., 1997; OSBORN, et al., 1997; KIYONO, et al., 1999; SASAKI et al., 2005; SCHUÉ et al., 2009; DASH; DAS, 2012; JAN et al., 2016).

Nesse sistema o gene *merR* é responsável por regular o operon, ativando ou reprimindo a região promotora/operadora. Em todas as proteínas MerR há três resíduos de cisteínas conservados, corroborando que esse é o sítio de ligação do Hg, já que este possui alta afinidade pelos resíduos de cisteína (ROSS et al., 1989).

Figura 2- Esquema de representação do mecanismo de redução pelo operon *Mer*.



Fonte: Adaptado de BARKAY et al. (2003).

Quando não há a presença de Hg^{2+} dentro da célula, a proteína MerR se liga com o promotor como um homodímero, que é uma região de dupla simetria conhecida como MerO (operador), situada entre os sítios de reconhecimento da RNA polimerase do promotor dos genes estruturais (P_t) à montante do gene *merT* (SUMMERS, 1992). O gene *merR* possui um promotor próprio (P_r) que é lido independente de P_t , sobrepondo-se com este, desta forma ele ocupa o lugar de MerO acontecendo assim a transcrição do próprio *merR* pela RNA polimerase (regulador negativo). Sabe-se que mesmo na ausência do indutor Hg, MerR tem a capacidade de se ligar às subunidades de RNA polimerase na região P_t , fazendo com que aja a deformação da região, mantendo assim a estabilidade da não transcrição (ANSARI et al., 1995).

De acordo com alguns trabalhos há operons *mer* que possuem o gene *merD*, que atua como repressor da expressão do operon (BELLIVEAU; TREVORST, 1989; MILLER, 1999). Este gene está localizado a jusante de *merA*, codifica a proteína MerD,

que possui uma região N-terminal similar a MerR, contudo ela é traduzida em pequenas quantidades (LEE et al., 1989).

O gene *merP* está relacionado ao transporte do Hg do periplasma para a membrana da célula bacteriana, por meio da codificação de uma proteína localizada no espaço periplasmático (BELLIVEAU; TREVORST, 1989; MILLER, 1999; BROWN et al., 2002). Em bactérias Gram-negativas são utilizados dois resíduos de cisteína pela MerP (proteína mercúrio periplasmática), a fim de deslocar o Hg^{2+} até entrarem em contato com os resíduos proximais de cisteína da proteína MerT, codificada pelo gene *merT*. Ao interagir com o par distal de cisteínas, da proteína MerT, o Hg^{2+} é transportado para o citosol da célula, o qual sofrerá a redução por meio da MerA (mercúrio redutase) (BROWN et al., 2002).

A enzima mercúrio redutase é uma proteína citoplasmática, codificada pelo gene *merA*, a mesma é a responsável por reduzir o Hg^{2+} a Hg^0 por meio de uma reação dependente de NADPH como doador de elétrons (BELLIVEAU; TREVORST, 1989; OSBORN et al., 1997; MILLER, 1999; BARKAY et al., 2003).

As bactérias que apresentam resistência de amplo espectro possuem o operon *mer* acrescido de um sexto gene, este é o gene *merB*, responsável por codificar a enzima organo mercúrio liase, esta, é uma proteína citoplasmática com função de quebrar a ligação carbono-mercúrio de compostos organomercuriais, tendo como produtos dessa reação é o CH_4 e o Hg^{2+} . Ou seja, bactérias que possuem o mecanismo de resistência de amplo espectro, ao Hg, contam com a atuação direta tanto do gene *merA*, quanto do gene *merB* (BARKAY, 1985).

Alguns operons *mer* possuem genes adicionais que são eles: *merC*, presente em operons *mer* de transposons *Tn21*, codifica a proteína MerC, que desempenha a função de transporte do Hg^{2+} através da membrana interna, tal gene não é essencial para a resistência ao Hg^{2+} em bactérias que possuem operons com os genes de transporte *merT* e *merP* (HAMLETT et al., 1992; SASAKI, 2005); *merE*, codificante da proteína MerE, é responsável por transportar o CH_3Hg^+ através da membrana interna de bactérias Gram-negativas (KIYONO et al., 2009; SONE et al., 2010); *merF*, codifica a proteína MerF, possui a função de transporte de Hg^{2+} através da membrana interna de células bacterianas que possuem o plasmídeo pMER327/419 (WILSON et al., 2000); *merH* codificante da proteína MerH, que desenvolve o papel de transporte do Hg^{2+} através da membrana interna, diferente das outras proteínas de transporte, citadas acima, não possui um segundo par de cisteínas, comoceptor dos íons de Hg, essencial para a importação desses

íons até o citoplasma, por isso, para que ocorra a atividade de MerH é necessária a presença da mercúrio redutase, no citoplasma, ou para atuar como um acceptor dos íons de Hg ou para causar uma mudança produtiva na conformação de MerH (SCHUÉ et al., 2009); e *merG*, codificante da proteína periplasmática MerG, que confere resistência ao $C_6H_5Hg^1$ (fenilmercúrio) através do mecanismo de efluxo (KIYONO; PAN-HOU, 1999).

A presença de genes de resistência ao Hg em plasmídeos e transposons de bactérias é um reflexo da poluição industrial e urbana (MINDLIN et al., 2005). Em resposta aos efeitos da poluição ambiental, comunidades microbianas nativas desenvolvem mecanismos de resistência ou formas de degradar compostos tóxicos (BARKAY et al., 1985).

Apesar de ambientes contaminados por Hg resultarem no desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos microrganismos nativos, no estudo de Kothari et al. (2019), ao compararem plasmídeos nativos de uma área contaminada, e outra não contaminada por Hg, puderam verificar que mesmo não havendo níveis de Hg detectáveis, na segunda área, foi encontrada uma grande abundância do plasmídeo codificante do operon *mer* indicando alta efetividade da redução e volatilização, pela comunidade microbiana nativa, de qualquer traço de Hg que possa ter sido lixiviado para a água subterrânea desse local.

2.6 A IMPORTÂNCIA DA MICROBIOLOGIA AMBIENTAL PARA O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA AMAZÔNIA

A microbiologia Ambiental que se tem nos dias atuais é uma ciência que alia a aplicação de conceitos biológicos, químicos e biotecnológicos com o objetivo de contribuir na solução de um dos grandes desafios da humanidade, que é a manutenção da qualidade ambiental (EMBRAPA, 2008).

O Brasil é um país que passa por diversos problemas ambientais, e sendo, a Microbiologia Ambiental, uma ciência que ainda se encontra em expansão, a integração entre pesquisadores é de fundamental importância na resolução de questões voltadas para a qualidade dos ecossistemas (EMBRAPA, 2008).

Conhecida mundialmente por possuir a maior floresta tropical do mundo, além de abrigar importantes reservas de água doce superficial e subterrânea (OLIVEIRA, 2007). A Região Amazônica é oriunda de uma formação geológica a qual propiciou heterogeneidade e diversas oportunidades ecológicas, traduzindo essas características em

uma megadiversidade (VIEIRA, 2008). Tais características fizeram com que inúmeras pesquisas, voltadas para a manutenção e uso sustentável dos recursos naturais, desse rico bioma, fossem desenvolvidas no intuito de mitigar os impactos gerados em seus ecossistemas.

A complexidade desses ecossistemas juntamente com a extração de recursos demonstra a necessidade do desenvolvimento de gestões inovadoras com vistas na manutenção do equilíbrio das condições ambientais. Desta maneira, a prospecção de microrganismos bem como seus produtos, na utilização de processos de biorremediação tem ganhado espaço em iniciativas voltadas para a qualidade desses ambientes (BATISTA, 2009).

A grande variabilidade genética dos microrganismos lhes confere a adaptação a condições ambientais adversas, inclusive ambientes contaminados por metais pesados. A investigação do potencial de microrganismos de degradar poluentes é a base da biorremediação. Desta maneira os microrganismos de interesse utilizados em pesquisas devem ser oriundos de ambientes com histórico de contaminação pelo poluente em estudo (BATISTA, 2009).

A contaminação de ecossistemas por metais se constitui como um dos principais objetos de estudo das ciências relacionadas ao ambiente. Isso se deve à persistência desses elementos, bem como aos efeitos nocivos que podem acarretar à saúde.

Tendo em vista o histórico uso de Hg nos garimpos de ouro da região Amazônica, que levou à emissão de toneladas desse metal para os compartimentos aquáticos, além das mudanças que vem ocorrendo em diversos rios com a construção de barragens, que são potenciais facilitadores do acúmulo de Hg no ambiente amazônico (ARRIFANO et al., 2018). A Microbiologia Ambiental se apresenta como uma ferramenta relevante para a concepção de alternativas que possam mitigar os eventuais impactos gerados pela contaminação de Hg nos ecossistemas amazônicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a resistência de bactérias ao mercúrio, e a presença do gene *merA* responsável pela redução enzimática do HgCl₂.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar potenciais bactérias resistentes ao mercúrio, presentes na água e sedimentos de fundo;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória dos isolados obtidos;
- Identificar os gêneros de bactérias resistentes, a partir do sequenciamento da região 16S RNA;
- Detectar a presença do gene *merA* do operon *mer* nos isolados bacterianos.

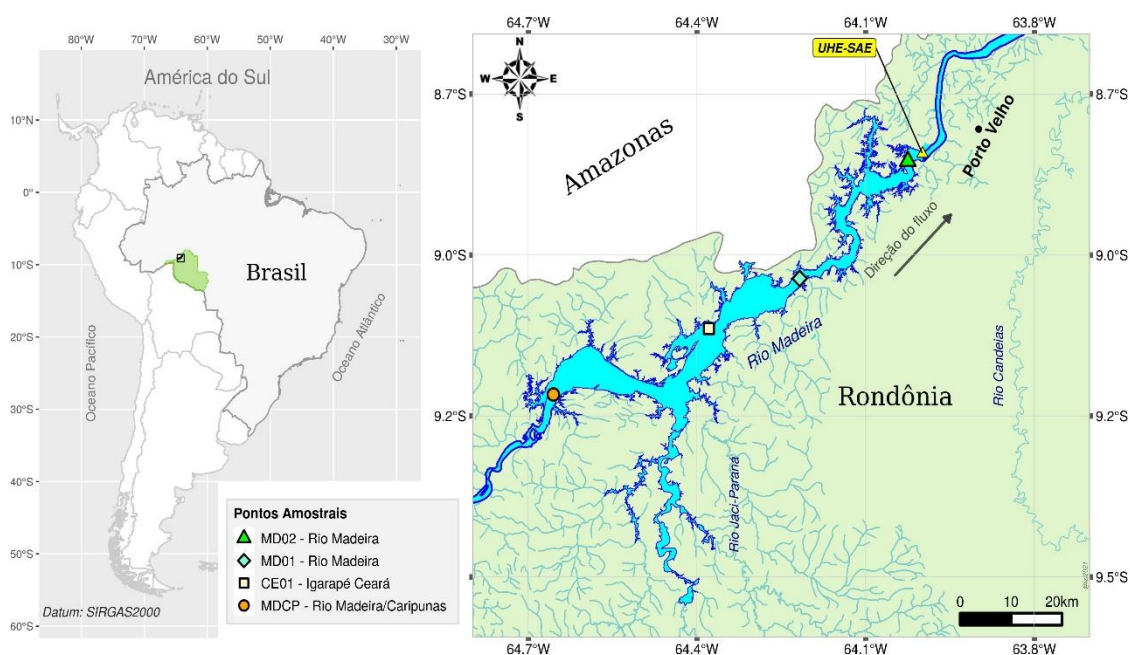
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE AMOSTRAGEM

A área de coleta localiza-se na bacia do alto rio Madeira, próximo à cidade de Porto Velho – RO, compreendendo 4 estações de coleta, dentro do programa de monitoramento hidrobiogeoquímico da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio Energia (UHE-SAE), sendo elas: rio Madeira/Caripunas (MDCP), Madeira 01 (MD01), Madeira 02 (MD02) e Igarapé Ceará (CE01). Todos os pontos estão localizados a montante da UHE Santo Antônio (Figura 3).

As coletas das matrizes de água e sedimento de fundo foram realizadas em duplicatas, por ponto, no mês de março de 2020, no período de águas altas. A escolha destas matrizes para este estudo se deu devido os processos de metilação e desmetilação do Hg ocorrerem na interface água-sedimento, sedimento ou na coluna de água (ZHANG; PLANAS, 1994).

Figura 3 – Área de amostragem com os pontos de coleta evidenciados no Rio Madeira.



Os pontos de coleta foram georeferenciados por meio do Sistema de Posicionamento Global por Satélite, através do aparelho receptor para GPS, marca Garmin®, modelo GPSmap 62sc. Os parâmetros adotados para o georeferenciamento foram: Sistemas de Coordenadas Geográficas, com segundos expressos até em três casas decimais e *Datum Horizontal oficial adotado pelo IBGE: SIRGAS2000 (Sistema de Referência Geocêntrico para as Américas)* (Quadro 1).

Quadro 1 – Pontos de coleta com suas respectivas localizações e coordenadas geográficas.

Código dos pontos	Coordenadas: UTM/Datum: SIRGAS2000		Descrição dos pontos de coleta
	Longitude	Latitude	
MDCP	322645,757	8982927,388	Rio Madeira, próximo ao Rio Caripunas a montante da Hidrelétrica Santo Antônio
CE01	353334,000	8995132,000	Igarapé Ceará aproximada, ente 7 km a montante da foz.
MD01	371247,682	9004371,914	Rio Madeira, próximo às corredeiras dos Morrinhos.
MD02	392579,799	9025917,021	Rio Madeira a montante da Hidrelétrica Santo Antônio.

4.2 AMOSTRAS DE ÁGUA

Foram coletadas amostras de água da superfície e fundo nos pontos de coleta Rio Madeira e Igarapé Ceará. A coleta da água de superfície foi realizada manualmente na profundidade de 10 cm, já a água de fundo foi coletada, na profundidade de 5m, com auxílio de uma garrafa de Van Dorn vertical de PVC (Limnotec), com capacidade para 5 L. As amostras de água foram acondicionadas em tubos falcon, graduado, estéreis, com capacidade para 50 mL (figura 4), e mantidas refrigeradas até serem levadas para o Laboratório de Microbiologia/CEPEM e realizadas as culturas por enriquecimento e isolamento bacteriano.

Figura 4 – Coleta de água de fundo para cultura bacteriana.



Fonte: Próprio autor

4.3 AMOSTRAS DE SEDIMENTO DE FUNDO

A coleta da matriz sedimento de fundo foi realizada com o auxílio da draga de Van Veen, em aço inox (figura 5), as quais foram acondicionadas em tubos falcon, graduados, estéreis, com capacidade para 15 mL (figura 6), e mantidas refrigeradas até serem levadas para o Laboratório de Microbiologia/CEPEM para a preparação de cultura por enriquecimento e isolamento bacteriano.

Figura 5 – Draga de Van Veen para amostragem de sedimento de fundo.



Fonte: Próprio autor

Figura 6 – Coleta de sedimento de fundo para cultura bacteriana.



Fonte: Próprio autor

4.4 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA

Os parâmetros físico-químicos da água (pH, condutividade elétrica, oxigênio dissolvido e turbidez) foram adquiridos a partir do relatório do programa de Monitoramento Limnológico e de Macrófitas Aquáticas da UHE Santo Antônio. As medições foram realizadas por meio da utilização de sonda multiparâmetros modelo YSI 6920.

4.5 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE HgT NAS ÁGUAS E SEDIMENTOS DE FUNDO

A avaliação das concentrações de mercúrio total (HgT) em água e sedimento de fundo, foi realizada a partir da análise do banco de dados do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang C. Pfeiffer (LABIOGEOQ-UNIR). Para esta análise foram utilizados os resultados de HgT obtidos a partir das amostras dos pontos MDCP, MD01, MD02 e CE01 abrangidas dentro do programa de monitoramento hidrobiogeoquímico da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio Energia (UHE-SAE). As concentrações de HgT em água foram determinadas pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Fluorescência Atômica (CVAFS-Brooks Rand), e em sedimento de fundo pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica acoplada ao gerador de vapor a frio (FIMS400, Perkin Elmer), equipado com sistema de injeção de fluxo (FIAS), com amostrador automático (AS10).

4.6 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO Hg POR ENRIQUECIMENTO

O isolamento de bactérias resistentes ao Hg foi realizado, em triplicata por ponto amostral, a partir da técnica de enriquecimento, adaptado de Takeuchi et al. (2005). Foram adicionados 0,1g de amostras de sedimento (peso úmido) e 0,1 mL de água a 10 mL de caldo Luria Bertani (enzymatic digest of casein 10g.L⁻¹, yeast extract 5g.L⁻¹, NaCl 10g.L⁻¹) contendo duas diferentes concentrações de HgCl₂ (Sigma-Aldrich): 2,5 µM e 20 µM, e incubadas por 24 horas a 35 °C.

Após o período de 24 h foi transferido 1 mL, da cultura enriquecida, para tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo LB, com as mesmas concentrações que as iniciais de HgCl₂, e incubadas por 24 h a 35 °C, este procedimento foi realizado três vezes consecutivas. Posteriormente, foi realizada a semeadura em placas com 10 mL de agar LB (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, MI, EUA), suplementado com as concentrações de HgCl₂ (Sigma-Aldrich): 2,5 µM e 20 µM, seguido de incubação a 37 °C por 24 h. Para a seleção das colônias foi priorizado os diferentes aspectos macromorfológicos entre si.

Visto que, na literatura, ainda não há um valor de referência para a classificação de uma bactéria resistente ou sensível ao Hg, nem qual o meio de cultura ideal, para essa

avaliação, optou-se por utilizar duas concentrações para a seleção inicial dos microrganismos.

Essas concentrações foram baseadas no trabalho de Sotero-Martins et al. (2008) com algumas adaptações, bem como a utilização do meio LB. Sendo a concentração, 5 μM 7X menor que a maior concentração, de resistência, encontrada no referido estudo, e a concentração de 20 μM 8X maior que a menor concentração aqui utilizada.

4.7 TESTE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC)

O teste de concentração mínima inibitória foi realizado conforme Andrews (2001), com algumas adaptações. Neste, a concentração de HgCl_2 capaz de inibir o crescimento microbiano foi considerada a concentração inibitória mínima desse metal, em relação ao microrganismo avaliado.

Os isolados obtidos, na cultura de enriquecimento, foram semeados em tubos de ensaio contendo 4 mL de caldo LB (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, MI, EUA), e incubados a 35°C em overnight. A partir dessas culturas, foi realizada a diluição do inóculo, conforme BrCAST (2017) para que a DO fosse ajustada para 0,5 da escala McFarland.

Para o teste de MIC, foi inoculado, em placas de 96 poços, 2 μL da cultura líquida, na forma de *spots*, em 100 μL de caldo LB suplementado de 4 diferentes concentrações de HgCl_2 : 2,5 μM , 20 μM , 80 μM , 250 μM . Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, sendo avaliadas visualmente pela turvação do meio. O MIC foi realizado em triplicata por amostra. Como controle negativo foi utilizado apenas o meio LB suplementado com as 4 concentrações de HgCl_2 , e como controle positivo foi utilizado o meio LB acrescido dos isolados bacterianos sem a adição de HgCl_2 .

4.8 IDENTIFICAÇÃO DO GENE *merA* POR PCR CONVENCIONAL

Os isolados com MIC > 20 μM foram selecionados para a identificação do gene *merA*. Para a extração de DNA, as colônias resistentes ao Hg foram inoculadas em caldo LB, e incubadas a 30 °C por 24 horas. Após o crescimento, o DNA dos isolados foi extraído utilizando a técnica de extração térmica, adaptado de Rowlands et al. (2006).

Para a detecção do gene *merA* foram utilizados os primers Forward F1 - 5' TCGTGATGTTTCGACCGCT 3' and Reverse F2 - 5' TACTCCCGCCGTTTCCAAT 3'

com fragmento de amplificação de 431 pares de base (SOTERO-MARTINS et al, 2008). O protocolo para PCR foi otimizado para a amplificação do fragmento. O mix para reação foi o seguinte: 1X tampão de reação, 1,5 mM MgCl₂, 1 μM dos primers, 0,2 mM de dNTPs, 0,5 U de Taq DNA polymerase , 4 μL de água ultrapura e 1 μL de DNA.

O programa básico de amplificação foi realizado, em termociclador (Applied Biosystems, Veriti 96-well), com as seguintes condições: 1 ciclo a 94 °C por 1 minuto; seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, e 72 °C por 1 minuto; 1 ciclo final de 72 °C por 7 minutos.

Após a amplificação dos fragmentos foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% por 25 minutos a 100V, como agente intercalante, foi utilizado 2 μL de GelRed (Biotium, USA). A PCR foi realizada no laboratório de microbiologia do CEPEM/FIOCRUZ-RO (Centro de Pesquisa em Medicina Tropical).

4.9 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS TOLERANTES/RESISTENTES POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 16S rRNA

Para a PCR de amplificação do DNA ribossômico bacteriano, foram utilizados os primers: 16S08F (GYCCADACWCCTACGG) e 16S08R (CACGAGCTGACGAC), com o seguinte mix de reação: 0.5 μM de cada primer, 0.25 mM de dNTP's, 2.5 mM MgCl₂, 1X de tampão de reação (DNA express Taq DNA Polymerase), 2U de Taq DNA polimerase e 50 ng de DNA (ARRUDA et al., 2017). O programa para amplificação das sequências-alvo foi: 1 ciclo inicial de extensão de 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, uma temperatura de anelamento de 55 °C por 30 segundos, 68 °C por 1 minuto; seguido de uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os amplicons foram purificados com o *QIAquick PCR purification Kit* (QIAGEN, Germany) de acordo com as especificações do fabricante.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como tratamento estatístico para os parâmetros físico-químicos, da água do Rio Madeira, e para a avaliação das concentrações de HgT, tanto do Rio Madeira quanto do Igarapé Ceará, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($\alpha=0,05$), em seguida foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico) ($p<0,001$), e teste de Dunn *a posteriori*. Para os parâmetros físico-químicos da água do Igarapé Ceará, devido ao n

amostral, não foi realizado teste de normalidade, foram calculadas as médias e seus respectivos desvios-padrão. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os dados do programa de monitoramento limnológico e de macrófitas aquáticas da UHE - Santo Antônio (condutividade elétrica, potencial Hidrogeniônico, oxigênio dissolvido e turbidez) foram ordenados conforme o sistema (Rio Madeira e Igarapé Ceará) em função do regime hidrológico (enchente, águas altas, vazante e águas baixas), a fim de permitir um entendimento mais abrangente do comportamento do elemento Hg.

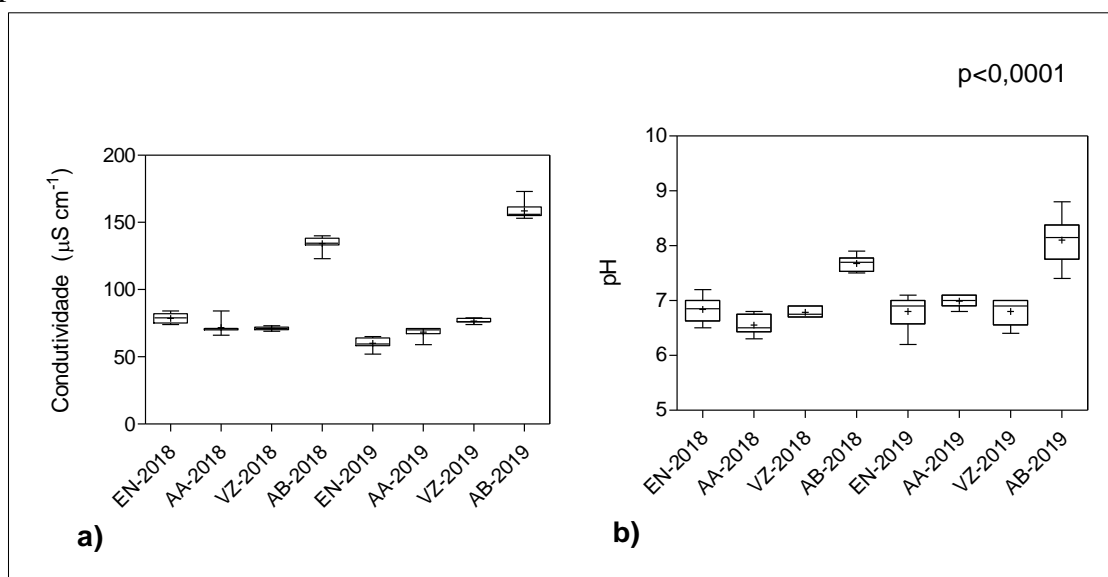
5.1.1 Condutividade elétrica e pH

A condutividade elétrica pode ser definida como a capacidade da água em transmitir corrente elétrica na presença de substâncias dissolvidas, que se dissociam formando cátions e ânions (FUNASA, 2014).

A figura 7 e 8 representam os valores de condutividade elétrica e pH, do sistema Madeira e Igarapé Ceará, respectivamente, nos anos de 2018-2019, na forma de boxplots.

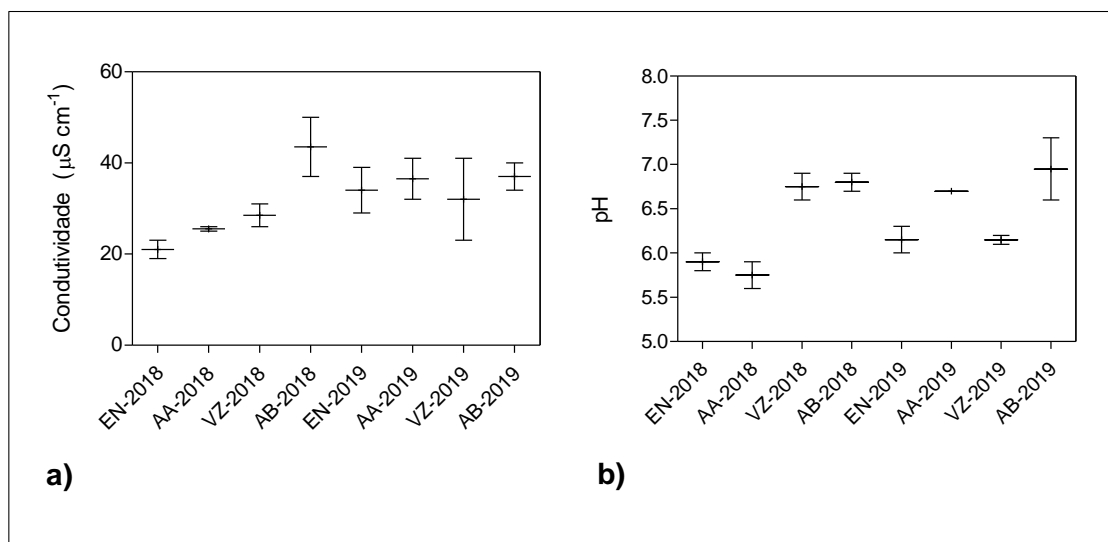
As médias das condutividades elétricas dos sistemas Madeira e Ceará foram respectivamente 89,92 (\pm 34,06) e 32,25 (\pm 8,52) $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, esses valores podem ser explicados pelas características naturais do Rio Madeira, já que suas águas são ricas em material particulado em suspensão. Podemos observar que o regime hidrológico foi outro fator que exerceu influência sobre os valores encontrados, visto que os valores mais elevados aconteceram em águas baixas, período em que há menores volumes de água, e consequentemente menor diluição dos elementos-traço.

Figura 7 – Boxplots referentes aos resultados sazonais de a) condutividade elétrica e b) pH, do sistema Madeira.



EN = Enchente; AA = águas altas; VZ = Vazante; AB = Águas baixas.

Figura 8 – Bloxpts referentes aos resultados de a) condutividade elétrica e b) pH do Igarapé Ceará.



EN = Enchente; AA = águas altas; VZ = Vazante; AB = Águas baixas.

No estudo de Queiroz et al. (2009) foi constatado que em águas brancas como as do Rio Madeira, a somatória dos cátions e ânions é maior quando comparado a outros tipos de águas, podendo apresentar maiores valores de condutividade elétrica.

O pH representa a concentração de íons hidrogênio em uma solução aquosa, indicando sua acidez, neutralidade ou alcalinidade sendo um parâmetro relevante para determinar a qualidade de um corpo aquático. A especiação de algumas substâncias como

Al e Hg, por exemplo, são influenciadas pelos valores de pH (VIRAGHAVAM; KAPOOR, 1999; AGUIAR et al., 2002).

A média de pH para o Rio Madeira ($7,06 \pm 0,55$) foi maior que a do Igarapé Ceará ($6,39 \pm 0,47$). Estes valores podem ser explicados devido formação geológica da região Amazônica com concentrações consideráveis de Ca e Mg, aumentando os eletrólitos na água e conseqüentemente a alcalinidade. Além disso, há diferenças de pH nos diferentes tipos de água (GHILLEAN, 1980; JUNK; FURCH 1980). Rios de águas brancas, a exemplo do Rio Madeira, apresentam águas mais neutras, com pH entre 6,2 e 7,2 (SIOLI, 1984).

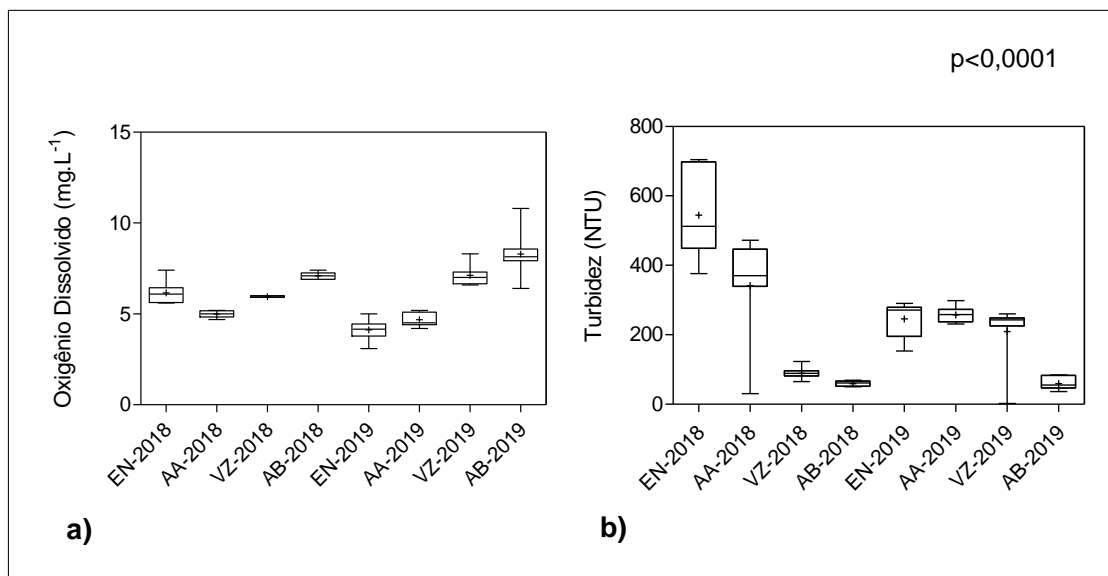
Podemos observar que os resultados, de condutividade elétrica e pH, tanto para o Rio Madeira quanto para o Igarapé Ceará, apresentaram um comportamento diretamente proporcional. Ao passo que a condutividade elétrica aumenta há um aumento do pH de suas águas. Esse comportamento está relacionado ao fato de que quanto menor for o pH, também será menor a capacidade de adsorção de elementos-traço às superfícies de partículas (VINHAL-FREITAS et al., 2010).

5.1.2 Oxigênio dissolvido e turbidez

Os valores de oxigênio dissolvido nas águas do Rio Madeira ($6,04 \pm 1,44 \text{ mg. L}^{-1}$) foram superiores aos encontrados no Igarapé Ceará ($4,19 \pm 1,99 \text{ mg. L}^{-1}$). Esse resultado se deve ao fato de que o Madeira se caracteriza por ser um ambiente lótico, com uma dinâmica mais energética do curso d'água, o que conseqüentemente propicia maior aeração das águas (ESTEVES, 2011).

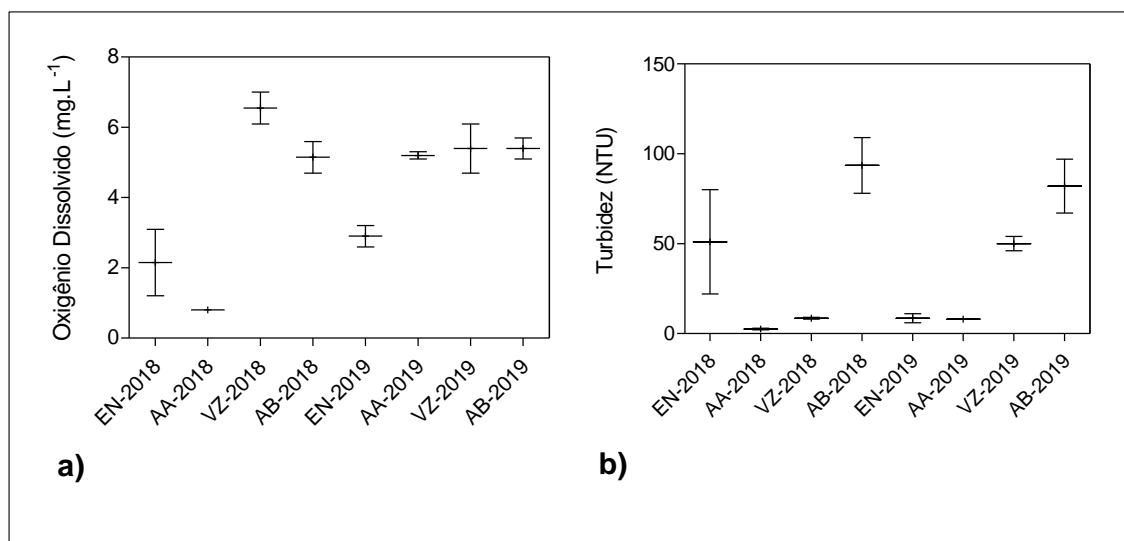
Quanto menores as concentrações de oxigênio dissolvido, maior o consumo do mesmo pela matéria orgânica, por meio de oxidação química e principalmente bioquímica, depurando assim a matéria orgânica (VALENTE et al, 1997).

Figura 9 – Boxplots referentes aos resultados sazonais de a) oxigênio dissolvido e b) turbidez, do sistema Madeira.



EN = Enchente; AA = águas altas; VZ = Vazante; AB = Águas baixas.

Figura 10 – Gráficos referentes aos resultados de a) oxigênio dissolvido e b) turbidez do Igarapé Ceará.



EN = Enchente; AA = águas altas; VZ = Vazante; AB = Águas baixas.

O parâmetro turbidez se refere ao grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessar a água, estando relacionada a presença de sólidos em suspensão que podem ser de origem natural, ou de origem antropogênica (SPERLING, 1996).

Os valores para turbidez apresentados para o Rio Madeira ($225,625 \pm 172,229$ NTU) foram significativamente superiores aos do Igarapé Ceará ($38 \pm 37,52$ NTU). Podemos observar nas figuras 9 e 10 que a sazonalidade influenciou diretamente na

turbidez tanto do Madeira quanto do Ceará. Tais resultados podem ser explicados pelas características naturais dos sistemas.

Para o Madeira, os altos valores, no período de enchente, coincidem com as variações climáticas da região andina, causando, a elevação da taxa de remobilização do sedimento de fundo (MORTATTI et al., 1989).

Já para o Igarapé Ceará os maiores valores de turbidez foram verificados no período de águas baixas. Esse resultado vai de encontro com o que diz Sioli (1984), o qual coloca que, sistemas de águas claras, é um conceito coletivo de águas quimicamente e biologicamente heterogêneas que têm como característica em comum a pobreza em partículas suspensas, podendo, também, mudar sazonalmente sua carga de sedimentos suspensos, e conseqüentemente sua transparência, de águas claras na estação seca para, o que ele chama, “sopa de ervilha” na estação chuvosa.

Tal observação pode estar relacionada à elevação do volume das águas do Rio Madeira, no período de águas altas, causando assim o represamento dos seus tributários, a exemplo do Igarapé Ceará. Esse represamento conseqüentemente diminui a velocidade de suas águas aumentando assim sua taxa de sedimentação.

5.2 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE HgT NAS ÁGUAS E SEDIMENTOS DE FUNDO

As pesquisas relacionadas ao estudo de bactérias resistentes ao Hg geralmente não trazem uma abordagem a respeito das concentrações desse metal nas amostras ambientais utilizadas para o isolamento dos microrganismos.

A avaliação das concentrações de Hg nas amostras ambientais se faz uma etapa importante no entendimento da relação entre a presença dos microrganismos potencialmente resistentes com o local no qual os mesmos foram coletados. Visto que, segundo Barkay; Olson (1986) mecanismos moleculares podem desenvolver um papel de adaptação, das comunidades bacterianas nativas, em resposta ao estresse causado pelo contaminante. Permitindo que esses microrganismos prosperem mesmo em ambientes com elevados níveis de Hg (JAN et al., 2016).

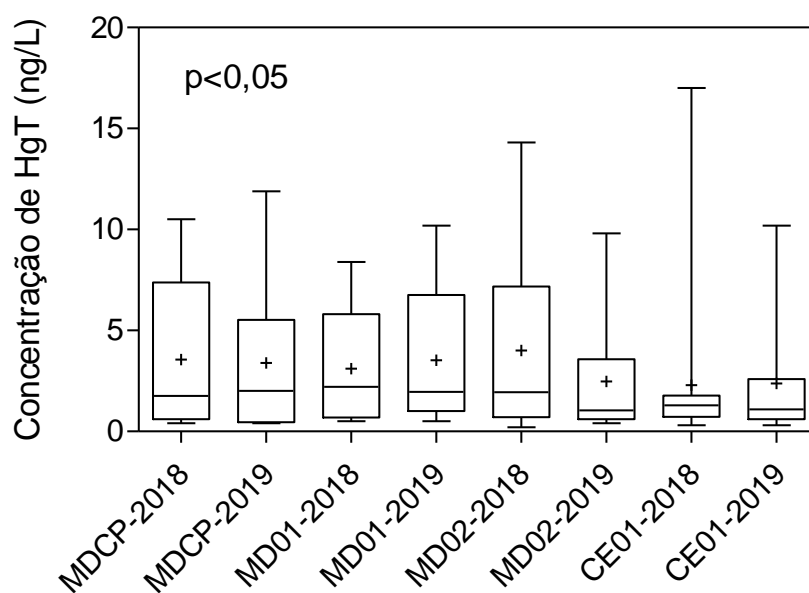
Os resultados obtidos para as amostras de água apresentaram valores abaixo do estabelecido pela resolução CONAMA 357 (BRASIL,2005), que determina o valor máximo, para água doce de classe I e II, de $0,0002 \text{ mg.L}^{-1}$ (200 ng.L^{-1}) Hg.

Os valores apresentados no teste de múltipla comparação ($p < 0,05$) não mostraram diferença significativa, nas comparações, entre os pontos nos anos 2018-2019

Os baixos valores de HgT encontrados pode ser atribuído ao fato de que em águas superficiais, o mercúrio na forma iônica pode estar complexado aos íons hidróxido e cloreto como: $\text{Hg}(\text{OH}^-)$, $\text{Hg}(\text{OH})_2$, HgCl^+ , HgClOH , HgCl_2 , bem como, parte do Hg^{2+} é encontrada ligada aos ácidos húmicos, quando presentes, e ao sulfeto (MOREL et al., 1998).

Podemos observar, na figura 11, que as menores médias das concentrações de HgT, nas águas, foram do ponto CE01, 2018 ($2,28 \pm 3,99 \text{ ng.L}^{-1}$) e 2019 ($2,37 \pm 3,08 \text{ ng.L}^{-1}$) com considerável variação para mais. Tal resultado pode estar relacionado a influência do histórico de emissão de Hg pelo garimpo nas águas do Madeira revelando, nos pontos coletados, maiores níveis do metal.

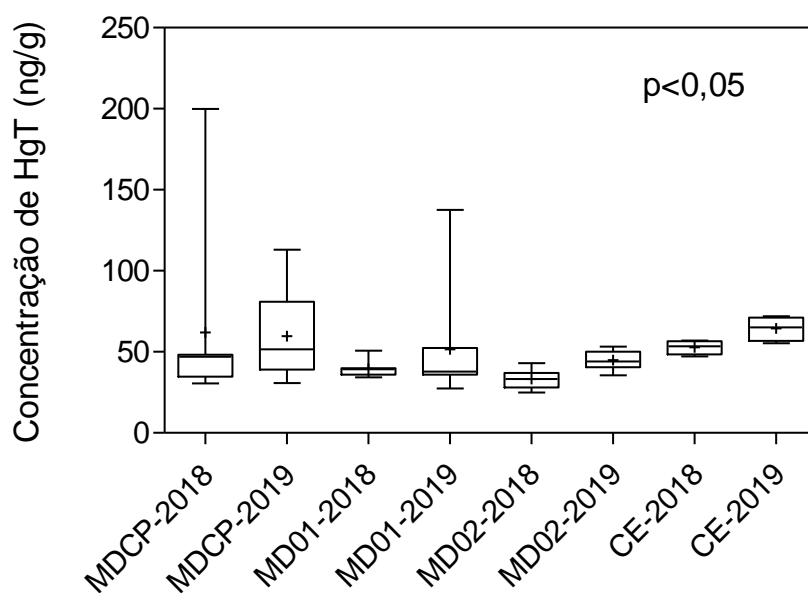
Figura 11 – Concentrações de HgT por ponto amostral na matriz água.



Em relação ao HgT em sedimentos, as concentrações apresentadas estão bem abaixo do valor limite de $0,486 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para possíveis efeitos tóxicos para a biota, estabelecidos pela resolução CONAMA 454 (BRASIL, 2012).

No geral, podemos verificar, na figura 12, que houve pouca variação nas concentrações do biênio 2018-2019, chamando atenção apenas o ponto MDCP, que em 2018 teve um máximo de 199 ng.g^{-1} ($0,199 \text{ mg.Kg}^{-1}$), valor esse que ultrapassa o nível 1 de $0,17 \text{ mg. Kg}^{-1} \text{ Hg}$ estabelecido pela resolução CONAMA 454 (BRASIL, 2012). No entanto, o mesmo não apresentou diferença significativa no teste de múltipla comparação ($p < 0,05$), sugerindo que tal resultado ocorreu de forma pontual. De acordo com Bastos; Lacerda (2004) a distribuição das concentrações de Hg tende a refletir entradas pontuais desse metal, em sedimentos fluviais, que é oriundo de rejeitos de dragas e balsas, estando como Hg elementar metálico possuindo baixa mobilidade sendo relativamente inerte.

Figura 12 – Concentrações de HgT por ponto amostral na matriz sedimento de fundo.



O mercúrio em sua forma iônica presente no sedimento se apresenta estável e geralmente não está biodisponível. Diferentemente de sua forma orgânica MeHg, que além de ser solúvel em água e biodisponível, possui meia-vida longa além de ser eliminado lentamente pelos organismos em comparação a outras formas mercuriais (WHO,1976).

Fazendo uma breve comparação entre os níveis de Hg, que podem ser encontrados, em amostras de água e de sedimento de fundo podemos observar que esses

níveis são superiores nos sedimentos de fundo. Visto que, em amostras de água doce, o Hg inorgânico ocorre principalmente como hidróxidos e, portanto, está menos disponível (ROBINSON; TUOVINEN, 1984; BARKAY, 1987)

5.3 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS RESISTENTES AO Hg

Ao longo da evolução, microrganismos expostos à metais tóxicos presentes no meio ambiente, desenvolveram mecanismos que lhes conferiram resistência a esses elementos. Essa resistência, em boa parte dos casos, está relacionada aos níveis de Hg presentes no ambiente os quais esses microrganismos estão inseridos, apesar de bactérias resistentes já terem sido isoladas em pesquisas que estudavam ambientes sem histórico de contaminação por Hg (HART et al., 1998; MINDLIN et al., 2005).

O cultivo de bactérias com a utilização do método de enriquecimento se mostra importante para o estudo, já que possui um papel de adaptação de microrganismos resistentes. De acordo com Grazziotin (2015), baixas concentrações de Hg no meio de cultivo podem não induzir suficientemente os genes do operon *mer*, já que a atividade da enzima mercúrio redutase é induzida e não constitutiva.

Segundo Gadd (1992) o termo resistência deve ser empregado quando a sobrevivência de microrganismos submetidos a compostos químicos tóxicos é decorrente de mecanismos específicos de detoxificação, em sua maioria codificados geneticamente.

Já o termo “tolerância”, a um elemento nocivo, seria decorrente de características bioquímicas ou estruturais intrínsecas dos organismos. Como por exemplo: A presença de parede celular impermeável ou a capacidade de produzir substâncias que podem imobilizar um metal tóxico no interior da célula bacteriana; ou mecanismos não específicos de defesa, não produzidos especificamente em resposta direta ao elemento tóxico.

A partir do isolamento bacteriano, por enriquecimento, de amostras de água de superfície e de fundo, e sedimento de fundo, foi obtido um total de 79 isolados, dos quais 15 foram de água de superfície, 24 de água de fundo e 40 de sedimento de fundo.

Quando comparamos a fase de superfície com a fase de fundo, em relação ao número total de isolados obtidos, verificamos que foi possível prospectar mais isolados bacterianos nas amostras de água de fundo conforme podemos ver na tabela 1.

Ao compararmos o número de isolados obtidos, por ponto, em razão das concentrações de HgCl₂, podemos verificar que os isolados de CE01 correspondem a

33,33% do número total de cepas isoladas para a concentração de 2,5 μM de HgCl_2 . Sendo que 82,05% do total de isolados para essa concentração foram obtidos em água de superfície. Já para a concentração de 20 μM a distribuição aconteceu de forma homogênea, visto que o número de isolados, em todos os pontos, para essa concentração correspondeu a 23,07% do total de isolados obtidos para a matriz água.

O pequeno número de isolados obtidos para a concentração de 20 μM de HgCl_2 pode estar relacionado às baixas concentrações de Hg encontradas em amostras de água. Visto que, no compartimento aquático o Hg associa-se rapidamente ao material em suspensão ou é incorporado em organismos biológicos, (MAURICE-BOURGOIN, et al., 2000). Como pôde ser observado na figura 11 do item 5.2.

Tabela 1 – Número de isolados prospectados, na matriz água, por ponto amostral e nas duas diferentes concentrações de HgCl_2 .

Ponto amostral	Isolados obtidos			
	Água de superfície		Água de fundo	
	2,5 μM	20 μM	2,5 μM	20 μM
MDCP	2	0	6	2
CE01	7	0	6	2
MD01	3	0	2	1
MD02	2	1	4	1
Total	14	1	18	6

O isolamento bacteriano, na matriz sedimento de fundo, apresentou homogeneidade no número total de cepas obtidas ao compararmos as duas concentrações de HgCl_2 (tabela 2). Sendo que o número de isolados obtidos, no ponto MD02, correspondeu a 35% do total de isolados obtidos para a matriz sedimento de fundo.

Ao compararmos o total de isolados em água de superfície, água de fundo e sedimento de fundo, podemos observar que o maior número de isolados obtidos foi em sedimento de fundo.

Este resultado pode estar associado às diferentes concentrações de Hg presentes nos compartimentos água e sedimento, visto que o Hg possui grande afinidade por partículas em suspensão que os carregam até o sedimento (OECD, 1995; MICARONI et al., 2000).

Tabela 2 - Número de isolados prospectados, na matriz sedimento, por ponto amostral e nas duas diferentes concentrações de HgCl₂.

Ponto amostral	Isolados obtidos em sedimento de fundo	
	2,5 µM	20 µM
MDCP	5	6
CE01	4	3
MD01	3	5
MD02	8	6
Total	20	20

5.4 TESTE DE CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (MIC)

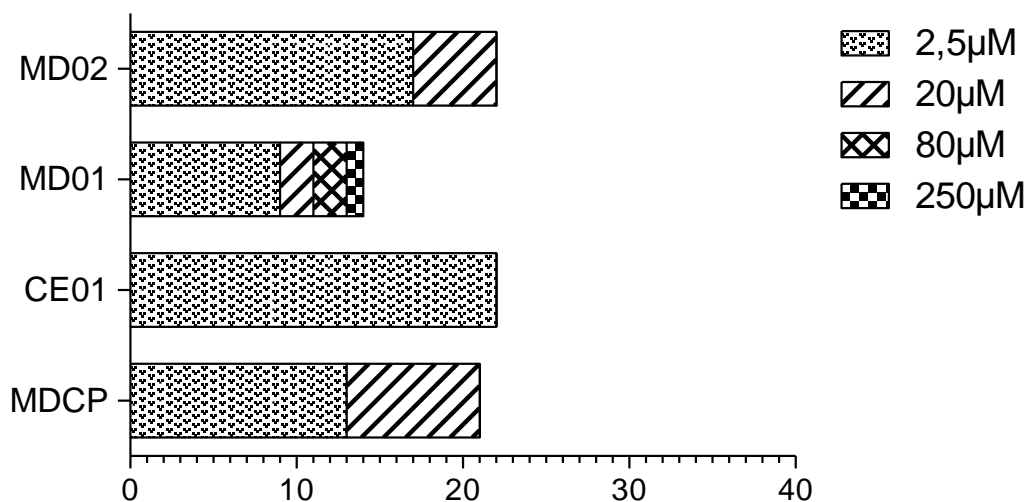
O ensaio de determinação do MIC, dos isolados bacterianos estudados, foi adaptado para os fins desta pesquisa, visto que os protocolos utilizados tradicionalmente na microbiologia clínica utilizam esse teste para a verificação de resistência a antibióticos.

Um dos fatores que traz a necessidade de adaptação é que, até o momento, não há na literatura valores de Hg estabelecidos para a definição de bactérias resistentes ou sensíveis a este metal, como se tem para os antibióticos, bem como também não há especificações em relação a qual meio de cultura ideal para os testes.

No decorrer dos ensaios foi observada uma relação inversamente proporcional entre a concentração de HgCl₂ adicionada ao meio e a capacidade de crescimento dos isolados bacterianos.

Ao compararmos as concentrações de HgCl₂ à capacidade de crescimento das cepas por ponto amostral podemos dar destaque a CE01 (n = 22) que apresentou 100% do crescimento das cepas inibidas a 20 µM, todos os isolados deste ponto só foram capazes de crescer na menor concentração 2,5 µM. Outro ponto amostral que podemos evidenciar é o MD01 que apresentou 1 cepa com MIC > 80 µM, este mesmo ponto também apresentou 1 cepa com crescimento para a maior concentração utilizada 250 µM, desta forma não foi observado o MIC desse isolado (figura 13). Em resumo, do total de 79 isolados testados 77,21% apresentaram MIC > 2,5 µM, e 22,78% tiveram o MIC > 20 µM.

Figura 13 – Número de isolados, com crescimento no teste de MIC, por ponto amostral.



Sotero-Martins et al. (2008) ao avaliarem, em caldo LB, o MIC de 100 isolados obtidos a partir de amostras de sistemas aquáticos, da Amazônia brasileira, verificaram que 9 cepas, com maior tolerância ao Hg, foram capazes de crescer em 17,5 μM Hg.

No trabalho de Vasconcellos (2010) ao determinar, em ágar nutriente, o MIC das cepas prospectadas de amostras de água do Rio Jamari, em Rondônia, foram obtidos isolados com MIC que variaram entre 10 μM a 20 μM Hg. Resultados esses semelhantes ao estudo de Bezerra (2012) com cepas também isoladas de amostras de água do Rio Jamari, sendo que dos 31 isolados obtidos todos apresentaram MIC = 10 μM .

No presente estudo ao detectarmos cepas com MIC > 80 μM e MIC > 250 μM , podemos afirmar que estas foram capazes de crescer em concentrações de 4 a 12 vezes maior, de HgCl_2 , que nos estudos realizados, na região Amazônica, aqui citados.

A diferença nos níveis de tolerância bacteriana ao Hg, entre o sistema apresentado neste estudo e os sistemas acima citados, pode estar relacionada ao histórico de emissão desse metal nestes ambientes, bem como aos tipos de matrizes utilizadas para a prospecção dos microrganismos.

Analisando as cepas do ponto CE01, quanto ao nível de tolerância, podemos constatar que os microrganismos prospectados, nas amostras desse ponto, apresentaram menor tolerância em relação aos demais pontos amostrados. Já as cepas prospectadas do ponto MD01 nos chamou a atenção devido apresentaram maior variação nos níveis de tolerância ao Hg, visto que foi possível obter isolados que cresceram desde a concentração de 2,5 μM até 250 μM (figura 14).

Quadro 2 – MIC dos isolados prospectados por matriz.

		Ponto amostral				Total
		MDCP	CE01	MD01	MD02	
Água de superfície	2,5 µM	1	7	3	3	14
	20 µM	1	0	0	0	1
	80 µM	0	0	0	0	0
	250 µM	0	0	0	0	0
Água de fundo	2,5 µM	4	8	2	1	15
	20 µM	4	0	0	1	5
	80 µM	0	0	1	0	1
	250 µM	0	0	0	0	0
Sedimento de fundo	2,5 µM	8	7	4	10	29
	20 µM	3	0	2	4	9
	80 µM	0	0	1	0	1
	250 µM	0	0	1	0	1

Ao analisarmos o crescimento das cepas estudadas no teste, em relação às matrizes, foi observado que 93,33% das cepas prospectadas em água de superfície apresentaram MIC > 2,5 µM, já em sedimento de fundo apresentaram maior variação nos níveis de tolerância, sendo que 22,5% dos isolados obtidos para essa matriz revelaram MIC > 20 µM (quadro 2). Tal resultado corrobora o estudo de Yaghoobizadeh et al. (2017) demonstrando que os diferentes valores de tolerância ao Hg podem ser explicados pela diferente origem dos locais de isolamento (água ou sedimentos), e os tipos de cepas estudadas.

De acordo com Haglund, et al. (2003) devido à grande quantidade de depósito de matéria orgânica encontrada em sedimentos, faz com que ocorra aí a maior parte das atividades de microrganismos, que desempenham um papel de fundamental importância no ambiente aquático.

A menor concentração de Hg utilizada no teste de MIC, de 2,5 µM (0,5 mg.L⁻¹), está acima do valor limite, de 0,486 mg. Kg⁻¹, estabelecido pela CONAMA 454, para possíveis efeitos tóxicos à biota. Já a maior concentração, de 250 µM (50 mg. L⁻¹), é 100X maior que a limite.

Visto que neste trabalho foi possível o isolamento de bactérias com MIC superiores a 80 e 250 µM fica claro que mesmo expostos a concentrações consideradas tóxicas, normalmente, as comunidades microbianas respondem a esse desafio por meio da evolução de populações resistentes, que mesmo na presença de componentes tóxicos

promovem a continuação de suas funções essenciais (SUMMERS; SILVER, 1978; DUXBURY; BICKNELL, 1983; JONAS et al., 1984; DUXBURY, 1986)

O MIC se mostrou relevante para a pesquisa, quanto à caracterização das cepas bacterianas isoladas, visto que o ensaio revelou os diferentes níveis de tolerância ao Hg.

5.5 IDENTIFICAÇÃO DO GENE *merA*

Estudos acerca da resistência bacteriana ao Hg são fundamentais na busca de conhecimentos sobre a adaptação da biota aquática aos níveis naturais ou antropogênicos desse metal no ambiente (NAKAMURA et al., 2001).

A identificação do gene responsável pela codificação da enzima mercúrio redutase foi realizada através da amplificação da região conservada do gene *merA* no DNA cromossômico de 18 isolados que apresentaram MIC > 20 µM.

Como podemos ver, na figura 14, apenas as cepas 58, 61, 81 e 84 apresentaram amplificação da região alvo, de 431 pb, do gene *merA*. Esse resultado permite classificar as mesmas como resistentes ao Hg.

As cepas 58 e 61 eram provenientes de amostras de sedimento, e as cepas 81 e 84 de água de fundo. O isolado 1, o único proveniente de amostras de água de superfície, não revelou a amplificação da região de interesse.

Figura 14 – Amplificação do fragmento *merA* de resistência ao Hg.

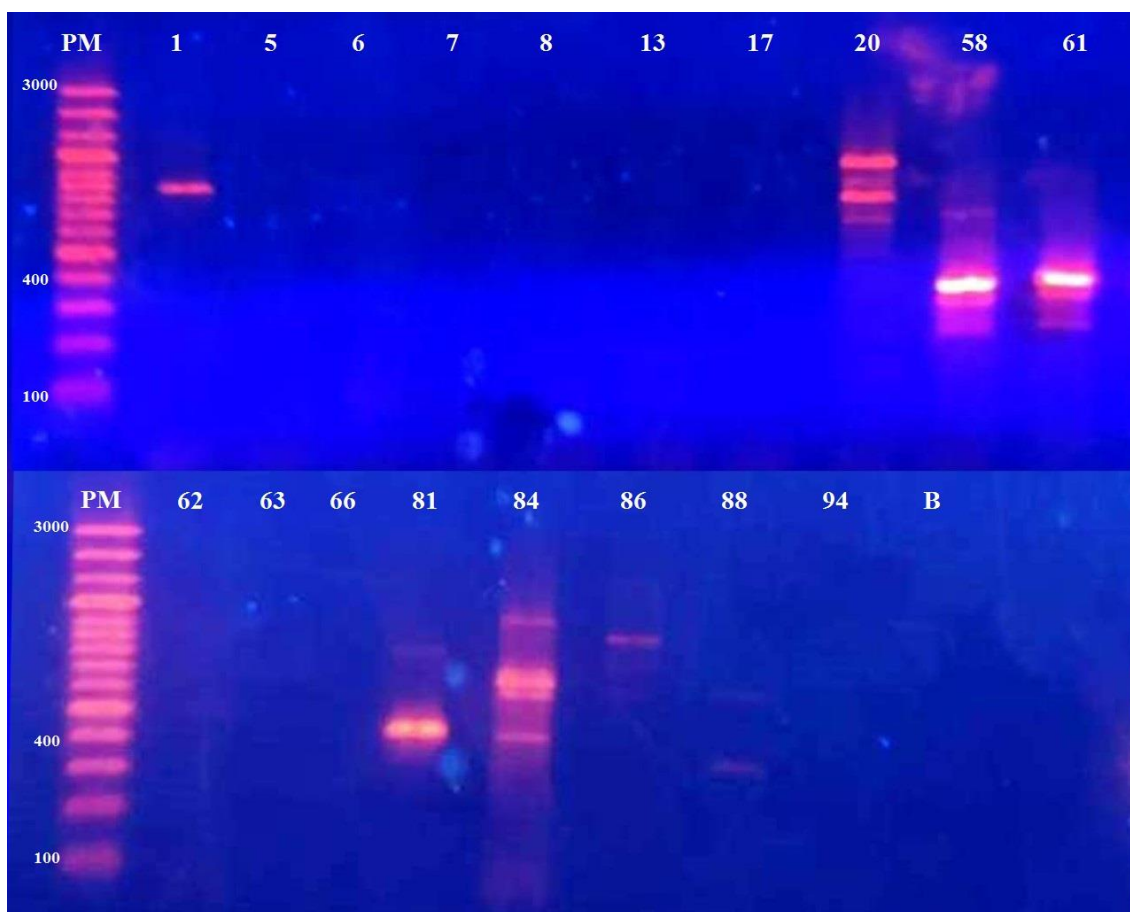


Foto do gel de agarose 1%. PM = Padrão de peso molecular, 3000pb; 1-94 = isolados selecionados para a amplificação do gene *merA*; B = Branco.

No estudo realizado por Barkay; Olson (1986) foi verificada uma correlação positiva na frequência do gene *mer* com as concentrações de Hg em sedimentos. No entanto uma amostra proveniente de sedimento, com elevada concentração de Hg, não apresentou o gene, sugerindo outros mecanismos adaptativos de resistência ao metal nessas populações.

Dos 14 isolados, os quais não foram detectados o gene *merA*, um nos chama a atenção, o isolado 62, que embora tenha atingido um MIC > 250 μ M não amplificou a banda de 431 pb. Desta forma o comportamento da cepa vai de encontro ao que se tem na literatura, já que trabalhos relacionam a presença deste gene a organismos que possuem alta resistência ao Hg (CLARK et al., 1977; BARKAY et al., 1990).

Em contrapartida, apesar desses 14 isolados não terem apresentado amplificação, da região específica, podemos considerar que mecanismos intrínsecos tenham conferido a capacidade de sobrevivência das mesmas tolerando elevadas concentrações de Hg.

É possível que alguns microrganismos sejam tolerantes ao Hg^{2+} em virtude de mecanismos menos específicos que o de resistência. Esses são capazes de crescer em concentrações de Hg^{2+} acima daquelas toleradas pela maioria das populações microbianas. Contudo podem ter seu crescimento inibido em concentrações nas quais microrganismos capazes de reduzir o Hg^{2+} podem crescer (BALDI et al., 1989).

Um desses mecanismos está relacionado ao bloqueio do íon tóxico, impossibilitando sua entrada na célula, caso entre na célula, o mesmo, é imobilizado em vesículas (OSBORN et al., 1997, NIES, 1999 MATHEMA et al., 2011).

Outro mecanismo o qual podemos citar é a produção de polissacarídeos extracelulares, descrita por Bitton; Freihofner (1978). Em grandes quantidades, esses polissacarídeos podem atuar como complexantes de íons de mercúrio fora do ambiente celular reduzindo a toxicidade do metal para a célula.

Baldi et al. (1989) reiteram que, resistências não específicas como a complexação de envelope celular ou produção de H_2S diminuem a toxicidade de outros cátions metálicos. Desta forma, existe uma dificuldade em definir a resistência microbiana ao Hg e quais as concentrações indicativas de resistência. O mesmo define resistência, em seu estudo, como a capacidade de produzir Hg^0 a partir de HgCl_2 ou compostos organomercuriais.

Outra possibilidade, em relação a não amplificação da região-alvo, é que a sequência nucleotídica, utilizada no presente estudo, não tenha hibridizado com diferentes sequências *merA* que possam estar presentes nessas bactérias. Segundo Barkay et al. (1990) genes que não são detectados pela sequência *mer* empregada, podem possuir sequências de nucleotídeos suficientemente divergentes, de modo que a hibridização cruzada não poderia ocorrer.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS TOLERANTES/RESISTENTES

A identificação, por meio do sequenciamento da região 16S rRNA, foi realizada apenas nos 18 isolados que apresentaram $\text{MIC} > 20\mu\text{M}$. Conforme representado, no quadro 3, houve uma predominância de bactérias Gram-negativas com representantes das famílias Enterobacteriaceae (10), Moraxellaceae (4), Aeromonadaceae (1) e Pseudomonadaceae (1). Sendo apenas dois isolados Gram-positivos, ambos pertencentes à família Bacillaceae.

Quadro 3 – Isolados identificados pelo sequenciamento da região 16S rRNA.

Amostra	Espécie	Sequência de identificação	Família	MIC
1	<i>Enterobacter ludwigii</i>	MT374261.1	Enterobacteriaceae	> 20
5	<i>Enterobacter mori</i>	MT613362.1	Enterobacteriaceae	> 20
6	<i>Bacillus cereus</i>	MK640829.1	Bacillaceae	> 20
7	<i>Bacillus albus</i>	MT611870.1	Bacillaceae	> 20
8	<i>Aeromonas hydrophila</i>	CP053859.1	Aeromonadaceae	> 20
13	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	MT557032.1	Enterobacteriaceae	> 20
17	<i>Klebsiella variicola</i>	MK872305.1	Enterobacteriaceae	> 20
20	<i>Klebsiella variicola</i>	MT509531.1	Enterobacteriaceae	> 20
58	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	MT052388.1	Moraxellaceae	> 80
61	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	MT052388.1	Moraxellaceae	> 80
62	<i>Acinetobacter junii</i>	KT273324.1	Moraxellaceae	> 250
63	<i>Escherichia coli</i>	CP000247.1	Enterobacteriaceae	> 20
66	<i>Acinetobacter junii</i>	MT613873.1	Moraxellaceae	> 20
81	<i>Serratia marcescens</i>	CP055161.1	Enterobacteriaceae	> 20
84	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	CP035207.1	Enterobacteriaceae	> 20
86	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MT197266.1	Enterobacteriaceae	> 20
88	<i>Enterobacter ludwigii</i>	CP039741.1	Enterobacteriaceae	> 20
94	<i>Pseudomonas sp.</i>	MT484231.1	Pseudomonadaceae	> 20

Dos 18 isolados tolerantes 4 apresentaram resistência com a amplificação do gene *merA*, conforme item 5.5, sendo eles Gram-negativos. No trabalho de Sotero-Martins et al. (2008) dos 9 isolados, positivos para a presença do gene de resistência *merA*, todos eram Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae.

A resistência ao Hg, por bactérias Gram-negativas, também já foi relatada em outros estudos como os de Giovanella et al. (2011) ao isolarem bactérias provenientes de lodo e efluente líquido de um sistema de tratamento de resíduos, no Rio Grande do Sul; Aram et al. (2012), ao isolarem bactérias do lago Maharloo no Irã; e Jan et al. (2016) ao isolarem bactérias de corpos d'água na Índia.

De acordo com Osborn et al. (1997) a observação de sequências, que conferem resistência ao Hg, significativamente idênticas, relatadas em locais tão distantes, geograficamente, sugerem uma disseminação global dessas sequências, possivelmente por dispersão aérea, ou alternativamente, tais sequências possam ter origens antigas, que se dispersaram há milhões de anos.

Quando fazemos a busca de estudos que envolvem o isolamento de bactérias que possuem genes do operon *mer* podemos notar que a maior parte desses isolados são de bactérias Gram-negativas.

Segundo Stapleton et al. (2004) o gene *merA*, de bactérias Gram-positivas, possui comprimentos diferentes em decorrência de variações consideráveis em suas sequências nucleotídicas, como por exemplo a variação de 1641 a 1896 pb na família Bacillaceae. Essas variações são causadas, principalmente, por alterações na extremidade 5' do gene que codifica o domínio N-terminal.

Os operons *mer*, isolados de bactérias Gram-positivas, possuem divergências em relação às sequências de Gram-negativas (OSBORN et al., 1997). Sendo essa uma das razões, da predominância, de pesquisas que resultam em mais isolados Gram-negativos que Gram-positivos.

No trabalho de Aram et al. (2012) foi verificado que o percentual de isolados Gram-negativos, resistentes ao Hg, foi maior em relação aos Gram-positivos. Os autores afirmam que, mesmo sob condições desfavoráveis, bactérias Gram-negativas são capazes de compartilhar, umas com as outras, de forma intraespecífica e interespecífica, genes de resistência ao Hg através do processo de conjugação. Além de que bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, funcionando como uma barreira para a entrada de compostos tóxicos para o citoplasma, sendo menos afetadas, pelo Hg, que bactérias Gram-positivas. Por isso são mais propensas de serem isoladas do meio ambiente.

7 CONCLUSÃO

Foi possível isolar bactérias tolerantes a 2,5µM Hg de amostras de água de superfície, fundo e sedimento de fundo tanto do Rio Madeira quanto do Igarapé Ceará (RO). No entanto, para água de superfície foi possível isolar uma única cepa, de um ponto do Rio Madeira, para a concentração de 20µM Hg.

As bactérias que apresentaram maiores níveis de tolerância foram isoladas de amostras de sedimento de fundo, sendo esses superiores a 20µM Hg, demonstrando que os diferentes níveis de tolerâncias ao Hg podem estar relacionados ao local de origem das cepas avaliadas.

Neste trabalho foram obtidos isolados que apresentaram níveis de tolerância de 4 a 12 vezes maiores, que microrganismos isolados em outros trabalhos realizados na região Amazônica, o que evidencia o histórico de lançamento de Hg nesse sistema.

Foram prospectados 2 isolados pertencentes à espécie *Acinetobacter nosocomialis*, 1 à *Serratia marcescens*, e 1 à *Klebsiella quasipneumoniae* sendo todas, Gram-negativas, resistentes ao Hg visto que revelaram possuir o gene *merA*, sugerindo uma possível remoção desse metal tóxico pela célula bacteriana. Por possuírem o gene *merA*, são microrganismos em potencial para outros estudos que visem uma futura aplicação na biorremediação de ambientes contaminados por Hg.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. **Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos.** Química Nova, v. 25, n. 6B, p. 1145-1154, 2002.

ALMEIDA, R.; BERNARDI, J. V. E.; OLIVEIRA, R. C.; CARVALHO, D. P.; MANZATTO, A. G.; LACERDA, L. D.; BASTOS, W. R.; **Flood pulse ans spatial dynamics of mercury in sediments in Puruzinho lake, Brazilian Amazon.** Acta Amazonica, v. 44, n. 1, p. 99-106, 2014.

ANDREWS, J. M. **Determination of minimum inhibitory concentrations.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 48, p. 5-16, 2001.

ANSARI, A. Z.; BRADNER, J. E.; O'HALLORAN, T. V. **DNA-bend modulation in a repressor-to-activator switching mechanism.** Nature, v. 374, p. 371-375, 1995.

ARAM, M.; SHARIFI, A.; KAFEELZADEH, F.; NAGHMACHI, M.; YASARI, E. **Isolating Mercury-resistant Bacteria from Lake Maharloo.** International Journal of Biology, v. 4, n. 3, p. 63-71, 2012.

ARRIFANO G. P. F.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R.C. R.; JIMÉNEZ-MORENO, M.; RAMÍREZ-MATEOS, V.; DA SILVA, N. F.S.; SOUZA-MONTEIRO, J. R.; OLIVEIRA, M. A.; PARAENSE, R. S. O.; MACCHID, B. M.; NASCIMENTO, J. L. M. CRESPO-LOPEZ, M. E. **Large-scale projects in the amazon and human exposure to mercury: The case-study of the Tucuruí Dam.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 147, p. 299-305, 2018.

ARRUDA, A.; FERREIRA, G. S.; LIMA, N. C. S.; SANTOS, A. J.; CUSTÓDIO, M. G. F.; MATOS, N. B.; OZAKI, L. S.; STABELI, R. G.; SILVA, A. A. **Asimple methodology to collect culturable bactéria from feces of Anopheles darlingi (Diptera: Culicidae).** Journal of Microbiological Methods, v. 141, p. 115-117, 2017.

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

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, v. 49, n. 3, p. 686-692, 1985.

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

BARKAY, T. **Adaptation of Aquatic Microbial Communities to Hg²⁺ Stress.** Applied and Environmental Microbiology, v. 53, n. 12, p. 2725-2792, 1987.

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 Tn501.** Applied and Environmental Microbiology, v. 56, n.6, p. 1695-1701, 1990.
- BARKAY, T.; MILLER, S. M.; SUMMERS, A. O. **Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems.** Microbiology Reviews, v. 27, p. 355-384, 2003.
- BARROCAS, P. R. G. **Assessment of mercury (II) species bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor.** Tese de doutorado. 197p. Florida State University, Tallahassee, 2003.
- BASTOS, W. R.; LACERDA, L. D. **A contaminação por mercúrio na bacia do Rio Madeira: Uma breve revisão.** Geochim. Brasil, v. 18, p. 99-114, 2004.
- BASTOS, W. R.; DÓREA, J. G.; LACERDA, L. D.; ALMEIDA, R.; COSTA, W. A. J.; MAÍIA, C. C.; SOUSA-FILHO, I. F.; SOUSA, E. A.; OLIVEIRA, I. A. S.; CABRAL, C. S.; MANZATTO, A. G.; CARVALHO, D. P.; RIBEIRO, K. A. N.; MALM, O. **Dynamics of Hg and MeHg in the Madeira River Basin (Western Amazon) before and after impoundment of a run-of-river hydroelectric dam.** Environmental Research, v. 189, p. 1-9, 2020.
- BATISTA, I. H. **Biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por resíduos de petróleo: um estudo com bactérias isoladas de *Eichornia crassipes* na Amazônia.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- BATTEN, K. M.; SCOW, K. M. **Sediment microbial community composition and methylmercury pollution at four mercury mine-impacted sites.** Microbial Ecology, v. 46, p. 429-441, 2003.
- BELLIVEAU, B. H.; TREVORST, J. T. **Mercury resistance and detoxification in bacteria.** Applied Organometallic Chemistry, v. 3, p. 283-294, 1989.
- BEZERRA, A. L. A. **Tolerância bacteriana ao mercúrio relacionada com a atividade da enzima mercúrio redutase.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2012.
- BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. **O comportamento do metilmercúrio (METILHg) no ambiente.** Química Nova, v. 27, n. 4, p. 593-600, 2004.
- BITTON, G.; FREIHOFER, V. **Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella aerogenes*.** Microbial Ecology, v. 4, p. 119-125, 1978.
- BOENING, D. W. **Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review.** Chemosphere, v. 40, n. 12, p. 1335-1351, 2000.
- BRABO, E. S. **Geoquímica do mercúrio na bacia do rio Tapajós: do natural ao antropogênico. Serie: Mercúrio na Amazônia.** Ananindeua, Pará, 274p. 2010.

BRASIL – **Resolução CONAMA 354 de 25 de março de 2012**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=445>> Acesso em: 04 de Setembro de 2019.

BRASIL – **Resolução CONAMA 357 de 17 de Março de 2005**. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>> Acesso em: 20 de Agosto de 2019.

BrCAST. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Teste sensibilidade aos antimicrobianos - Método de disco-difusão EUCAST**. 21p. 2017.

BROWN, N. L.; SHIH, Y.-C.; LEANG, C.; GLENDINNING, K. J.; HOBMAN, J. L.; WILSON, J. R. **Mercury Transport and Resistance**. Biochemical Society Transactions, v. 30, p. 715-718, 2002.

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

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

CHRISTENSEN GA, WYMORE AM, KING AJ, PODAR M, HURT RA, SANTILLAN EU, SOREN, A.; BRANDT, C. C.; BROWN, S. D.; PALUMBO, A. V.; WALL, J. D.; GILMOUR, C. C.; ELIAS, D. A. **Development and validation of broad-range qualitative and clade-specific quantitative molecular probes for assessing mercury methylation in the environment**. Applied and Environmental Microbiology, v. 82, p. 6068–6078, 2016.

CLARK, D. L.; WEISS, A. A.; SILVER, S. **Mercury and Organomercurial Resistances Determined by Plasmids in *Pseudomonas***. Journal of Bacteriology, v. 132, n. 1, p. 186-196, 1977.

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

COSTA, J. M. F. J.; LIMA, A. A. S.; RODRIGUES D. J.; KHOURY, E. D. T.; SOUZA, G. S.; SILVEIRA, L. C. L.; PINHEIRO, M. C. N. **Manifestações emocionais e motoras de ribeirinhos expostos ao mercúrio na Amazônia**. Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 20, n. 2, p. 212-224, 2017.

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

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, v. 82, p. 335-343, 1987.

DRISCOLL, C. T.; MASON, R. P.; CHAN, H. M.; JACOB, D. J.; PIRRONE, N. **Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects.** Environmental Science & Technology, v. 47, p. 4967-4983, 2013.

DUXBURY, T.; BICKNELL, B. **Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils.** Soil Biology and Biochemistry, v. 15, p. 243-250, 1983.

DUXBURY, T. **Ecological aspects of heavy metal responses in microorganisms.** Advances in Microbial Ecology, v. 8, p. 185-235, 1986.

EMBRAPA, **Microbiologia Ambiental.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna – SP, 2ª ed., 647p. 2008.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia. 2.** Rio de Janeiro: Interciências, 602 p. 2011,

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

FIGUEIREDO, B. R. **Minérios e Ambiente.** Campinas, UNICAMP, 334p., 2000.

FILIZOLA-JUNIOR, N. P. **O fluxo de sedimentos em suspensão nos rios da bacia Amazônica Brasileira.** ANEEL, Brasília, DF. 63p. 1999.

FUNASA. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS.** Fundação Nacional de Saúde. Brasília, 112p, 2014.

GADD, G. M. **Metals and microorganisms: A problem of definition.** Microbiology Letter, v. 100, p. 197-204, 1992.

GALVÃO, L. A. C.; COREY, G. **Mercurio.** Serie Vigilancia 7, Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, OPS/OMS, 69p., 1987.

GHILLEAN, T. P. A. **Terminologia dos tipos de florestas amazônicas sujeitas a inundação.** Acta Amazonica, v. 10, n. 3, p. 495-504, 1980.

GIOVANELLA, P.; BENTO, F.; CABRAL, L.; GIANELLO, C.; OLIVEIRA, F, A. **Isolamento e seleção de micro-organismos resistentes e capazes de volatilizar mercúrio.** Química Nova, v. 34, n. 2, p. 232-236, 2011.

GRAZZIOTIN P. G. **Caracterização de bactérias resistentes ao mercúrio e estratégias para biorremediação de ambientes contaminados.** Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

GRÉGOIRE, D. S.; POULAIN, A. J. **Shining light on recent advances in microbial mercury cycling.** Facets, v. 3, p. 858-879, 2018.

GUPTA, N.; ALI, A. **Mercury volatilization by R factor systems in *Escherichia coli* isolated from aquatic environments of India.** Current Microbiology, v. 48, p. 88–96, 2004.

HAGLUND, A. L.; LANTZ, P.; TORNBLOM, E.; TRANVIK, L. **Depth distribution of active bacteria and bacterial activity in lake sediment.** *Microbiology Ecology*, v. 46, p. 31-38, 2003.

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*, v. 174, p. 6377-6385, 1992.

HART, M.; ELLIOTT, G.N.; OSBORN, M.; RITCHIE, D.A.; STRIKE, P. **Diversity amongst *Bacillus merA* genes amplified from mercury resistant isolates and directly from mercury polluted soil.** *Microbiology Ecology*, v. 27, p. 73-84, 1998.

HELMANN, J. D.; WANG, Y.; MAHLER, I.; WALSH, C. T. **Homologous metalloregulatory proteins from both gram-positive and gram-negative bacteria control transcription of mercury resistance operons.** *Journal of Bacteriology*, v. 171, p. 222-229, 1989.

HORN, J.M.; BRUNKE, M.; DECKWER, W.D.; TIMMIS, K. ***Pseudomonas putida* strains which constitutively over express mercury resistance for biotransformation of organomercurial pollutants.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 357-362, 1994.

HSU-KIM, H.; KUCHARZYK, K. H.; ZHANG, T.; DESHUSSES, M. A. **Mechanisms regulating mercury bioavailability for methylating microorganisms in the aquatic environment: a critical review.** *Environmental Science & Technology*, v. 47, p. 2441-2456. 2013.

JAN, A. T.; AZAM, M.; CHOI, I.; ALI, A.; HAQ, Q. M. R. **Analysis for the presence of determinants involved in the transport of mercury across bacterial membrane from polluted water bodies of India.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 1, p.55-62, 2016.

JONAS, R. B.; GILMOUR, C. C.; STONER, D. L.; WEIR, M.; TUTTLE, J. H. **Comparison of methods to measure acute metal and organometal toxicity to natural aquatic microbial communities.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 47, n. 5, p. 1005-1011, 1984.

JUNK, W. J.; FURCH, K. **Química da água e macrófitas aquáticas de rios e igarapés na Bacia Amazônica e nas áreas adjacentes. Parte 1: Trecho Cuiabá - Porto Velho - Manaus.** *Acta Amazonica*, v.10, p. 611-633, 1980.

KEHRIG, H. A.; MALM, O.; PALERMO, E. F. A.; SEIXAS, T. G.; BAÊTA, A. P.; MOREIRA, I. **Bioconcentração e biomagnificação de metilmercúrio na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro.** *Química Nova*, v. 34, n. 3, p. 377-384, 2011.

KERPER, L.E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T.W. **Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier.** *American Journal of Physiology*, v. 262, n. 5, p. 761-765, 1992.

KING, J. K.; HARMON, S. M.; FU, T. T.; GLADDEN, J. B. **Mercury removal, methylmercury formation, and sulfate reducing bacteria profiles in wetland mesocosms.** Chemosphere, v. 46, p. 859-870, 2002.

KIYONO, M.; PAN-HOU, H. **The *merG* gene product is involved in phenyl mercury resistance in *Pseudomonas* strain K-62.** Journal of Bacteriology, v. 181, n. 3, p. 726–730, 1999.

KIYONO, M.; SONE, Y.; NAKAMURA, R.; PAN-HOU, H.; SAKABE, K. **The MerE protein encoded by transposon Tn21 is a broad mercury transporter in *Escherichia coli*.** FEBES Letters, v. 583, n. 7, p. 1127-1131, 2009.

KOMYO, E.; OYANAGI, S.; ITAI, Y.; TOKUNAGA, H.; TAKIZAWA, Y.; SUDA, I. **Patological findings on a fetal type of Minamata disease.** 242 p., 1993.

KOTHARI, A.; SONEJA, D.; TANG, A.; CALRSON, H. K.; DEUTSCHBAUER, A. M.; MUKHOPADHYAY, A. **Native Plasmid-Encoded Mercury Resistance Genes Are Functional and Demonstrate Natural Transformation in Environmental Bacterial Isolates.** Applied and Environmental Science, v. 4, n. 6, p. 1-12, 2019.

LACERDA, L. D; SALONANS, W. **Mercury from Gold and Silver Mining: A Chemical Time Bomb?** Environmental Science, 146p. 1998.

LACERDA, L. D; MALM, O. **Contaminação por mercúrio em sistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas.** Estudo Avançados, v. 22, n. 63, p. 173-190, 2008.

LARINI, L. **Toxicologia;** 3.ed. São Paulo: Manole, 1997.

LATRUBESSE, E.; STEVAUX, J.; SINHA, R. **Tropical rivers.** Geomorphology, v. 70, p. 187-206, 2005.

LECHLER, P. J.; MILLER, J. R.; LACERDA, L. D.; BONZONGO, D. J. C.; LYONS, W.B.; WARWICK, J.J. **Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments?** Science of the Total Environment, v. 260, p. 87-96, 2000.

LEE, I. W.; GAMBILL, B. D.; SUMMERS, A. O. **Translation of *merD* in Tn21.** Journal of Bacteriology, v. 171, n. 4, p. 2222-2225, 1989.

LU, X.; LIU, Y.; JOHS, A.; ZHAO, L.; WANG, T.; YANG, Z.; LIN, H.; ELIAS, D. A.; PIERCE, E. M.; LIANG, L.; BARKAY, T.; GU, B. **Anaerobic mercury methylation and demethylation by *Geobacter bemidjensis* Bem.** Environmental Science & Technology, v. 50, n. 8, p. 4366–4373, 2016.

MALM, O.; PFEIFFER, W. **Mercury pollution due to gold mining in the Madeira river Basin, Amazon / Brazil.** Ambio, v. 19, n. 1, p. 11-5, 1990.

MALM, O.; CASTRO, M. B.; BASTOS, W. R.; BRANCHES, F. J. P; GUIMARÃES, J. R. D.; ZUFFO, C. E.; PFEIFFER, W. C. **An assessment of Hg pollution in diferente**

goldmining areas, Amazon Brazil. *The Science of the Total Environment*, v. 175, n. 2, p. 127-140, 1995.

MASON, R.P.; REINFELDER, J.R.; MOREL, F.M.M. **Uptake, toxicity and trophic transfer of mercury in a coastal diatom.** *Environmental Science & Technology*, v. 30, p. 1835-1845, 1996.

MATHEMA, V. B.; THAKURI, B. C.; SILLANPAA, M. **Bacterial mer operon mediated detoxification of mercurial compounds: a short review.** *Archives of Microbiology*, v. 193, n. 12, p. 837-844, 2011.

MAURICE-BOURGOIN. L.; QUIROGA, I.; CHINCHEROS, J.; COURAU, P. **Mercury distribution in waters and fishes of the upper Rio Madeira and mercury exposure in riparian Amazonian populations.** *The Science of the Total Environment*, v. 260, p. 73-86, 2000.

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

MILLER, S. M. **Bacterial detoxification of Hg (II) and organomercurials.** *Essays Biochem*, v. 34, p. 17-30, 1999.

MINDLIN, S.; MINAKHIN, L.; PETROVA, M.; KHOLODII, G.; MINAKHINA, S.; GORLENKO, Z.; NIKIFOROV, V. **Present-day mercury resistance transposons are common in bacteria preserved in permafrost grounds sine Upper Pleistoceno.** *Research in Microbiology*, v. 156, p. 994-1004, 2005.

MIRANDA, M. R.; COELHO-SOUZA, S. A.; GUIMARÃES, J. R. D; CORREIA. R. R. S; OLIVEIRA, D. **Mercúrio em sistemas aquáticos: Fatores que afetam a metilação.** *Oecologia brasiliensis*, v. 11. n. 2, p. 240-251, 2007.

MOREL, F.M.M.; KRAEPIEL, A.M.L.; AMYOT, M. **The chemical cycle and bioaccumulation of mercury.** *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 29, p. 543-566, 1998.

MORTATTI, J.; FERREIRA, J. R.; MARTINELLI, L. A.; VICTORIA, R. L.; TANCREDI, A. C. F. **Biochemistry of the Madeira River Basin.** *Geo Journal*, v. 19, n. 4, p. 391-397, 1989.

NAJA, G. M.; VOLESKY, B. **Treatment of metal-bearing effluents: removal and recovery.** Em: WANG, L. K; CHEN, J. P.; HUNG, Y. T. *Handbook on heavy metals in the environment.* CRC Press, Boca Raton, p. 247–291, 2010.

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

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

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

NRIAGU, J. O.; PFEIFFER, W. C.; MALM, O.; SOUZA, C. M. M.; MIERLE, G. **Mercury pollution in Brazil.** Nature, v. 356, p. 389, 1992.

NRIAGU, J. O.; BECKER, C. **Volcanic emissions of mercury to the atmosphere: global and regional inventories.** The Science of the Total Environment, v. 304, p.3-12, 2003.

OECD. **Risk reduction monograph no. 4: Mercury – Background and National Experience with Reducing Risk.** Organisation for Economic Co-operation and Development. Environment Monograph series, n. 103, 1995.

OGA, S.; **Fundamentos de Toxicologia,** Atheneu ed., SP, 1996. 169 p.

OLIVEIRA, TEREZA C. S. **Caracterização de marcadores moleculares e uso de diferentes proxis para estudo do registro de combustão em sedimento na Amazônia Central (Coari-Manaus).** Tese de Doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, 2007. 193 p.

OREMLAND, R. S.; CULBERTSON, C. W.; WINFREY, M. R. **Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogens and sulfate reducers in oxidative demethylation.** Applied and Environmental Microbiology, v. 57, p. 130–137, 1991.

OSBORN, A. M.; BRUCE, K. D.; STRIKE, P; RITCHIE, D. A. **Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon.** Microbiology Reviews, v. 19, p. 239–262, 1997.

PODAR, M.; GILMOUR, C. C.; BRANDT, C. C.; SOREN, A.; BROWN, S. D.; CRABLE, B. R.; PALUMBO, A. V.; SOMENAHALLY, A. C.; ELIAS, D. A. **Global prevalence and distribution of genes and microorganisms involved in mercury methylation.** Science Advances, v. 1, n. 9, p. 1-12, 2015.

QUEIROZ, M. M. A.; HORBE, A. M. C.; SEYLER, P.; MOURA, C. A. V. **Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães – Amazonas – Brasil.** Acta Amazonica, v. 39, n. 4, p. 943-952, 2009.

RAVINA, D. M.; BAATH E. **Development of Metal Tolerance in Soil Bacterial communities Exposed to Experimentally Increased Metal Levels.** Applied and Environmental Microbiology, v. 62, p. 2970–2977, 1996.

ROBINSON, J. B.; TUOVINEN, O. H. **Mechanisms of Microbial Resistance and Detoxification of Mercury and Organomercury Compounds: Physiological, Biochemical, and Genetic Analyses.** Microbiological Reviews, v. 48, n. 2, p. 95-124, 1984.

ROSS, W. E.; PARK, S. J.; SUMMERS, A. O. **Genetic analysis of transcriptional activation and repression in the Tn21 mer operon.** Journal of Bacteriology, v. 171, p. 4009-4018, 1989.

SASAKI, Y.; MINAKAWA, T.; MIYAZAKI, A.; SILVER, S.; KUSANO, T. **Functional dissection of a mercuric ion transporter. MerC, from Acidithiobacillus ferrooxidans.** Bioscience, Biotechnology and Biochem, v. 69, n. 7, p. 1394–1402, 2005.

SCHAEFER, J. K.; SZCZUKA, A.; MOREL, F. M. M. **Effect of divalent metals on Hg(II) uptake and methylation by bacteria.** Environmental Science & Technology, v. 48, p. 3007–3013, 2014.

SCHUÉ, M.; DOVER, L.G.; BESRA, G. S.; PARKHILL, J.; BROWN, N. L. **Sequence and analysis of a plasmid-encoded mercury resistance operon from *Mycobacterium marinum* identifies MerH, a new mercuric ion transporter.** Journal of Bacteriology, v. 191, n. 1, p. 439–444, 2009.

SILVA, A. R. B.; GUIMARÃES, G. A.; COSTA, M. Q.; SOUZA, T. M. C. **A contaminação mercurial nos garimpos de ouro da Amazônia,** p. 51-90, 1994.

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

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

SILVER, S.; HOBMAN, J. L. **Mercury microbiology: resistance systems, environmental aspects, methylation, and human health.** Molecular Microbiology of Heavy Metals, v. 6, p. 357-370, 2007.

SIOLI, H. **The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types.** In: SIOLI, H. **The Amazon – Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin.** Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, p. 127-165, 1984.

SONE, Y.; PAN-HOU, H.; NAKAMURA, R.; SAKABE, K.; KIYONO, M. **Roles played by MerE and MerT in the transport of inorganic and organic Mercury compounds in Gram-negative bacteria.** Journal of Health Science, v. 56, n. 1, p. 123-127, 2010.

SOTERO-MARTINS, A.; JESUS, M. S.; LACERDA, M.; MOREIRA, J. C.; FILGUEIRAS, A. L. L.; BARROCAS, P. R. G. **A conservative region of the mercuric reductase gene (*merA*) as a molecular marker of bacterial mercury resistance.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 39, p. 307-310, 2008.

SPERLING, M. V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 2ed., Belo Horizonte, DESA, 143p. 1996.

STAPLETON, P.; PIKE, R. MULLANY, P.; LUCAS, V.; ROBERTS, G.; ROWBURY, R.; WILSON, M.; RICHARDS, R. **Mercuric resistance genes in gram-positive oral bacteria**. FEMS Microbiology Letters, v. 236, n. 2, p. 213-220, 2004.

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

SUMMERS, A. O. **Untwist and Shout: A heavy metal-responsive transcriptional regulator**. Journal of Bacteriology, v. 174, n. 10, p. 3097-3101, 1992.

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

TONOMURA, K.; MAEDA K.; FUTAI, K.; NAKAGAMI, T.; YAMADA, M. **Stimulative Vaporization of Phenyl-mercuric Acetate by Mercuric-resistant Bacteria**. Nature, v. 217, p. 644-646, 1968.

TREVORS, J. T.; **Mercury Methylation by Bacteria**. J. Basic Microbiol., v. 26, p. 499-504, 1986.

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

UNEP. **Minamata Convention on Mercury – Text and annexes**. United Nations Environment Programme, 67p, 2019.

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SIVA, A. M. M. **Oxigênio dissolvido (OD), demanda química de Oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no Ribeirão Lavapés/Botucatu – SP**. Eclética química, v. 22, p.1-13, 1997.

VASCONCELLOS, A. C. S. **Avaliação da resistência bacteriana ao mercúrio através da quantificação da redução do Hg (II) ao estado elementar**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

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

VIEIRA, L. J. S. **Biodiversidade Amazônica**. 2008. Disponível em http://www.bibliotecadafloresta.ac.gov.br/biblioteca/docs_expo/Biodiversidade.pdf. Acesso em 10/09/2020.

VIEIRA, S. M.; MALMEIDA, R.; HOLANDA, I. B. B; MUSSY, M. H.; GALVÃO, R. C. F.; CRISPIM, P. T. B.; DÓREA, J. G.; BASTOS, W. R. **Total and methyl-mercury in hair and milk of mothers living in the city of Porto Velho and villages along the Rio Madeira, Amazon, Brasil**. International Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 216, n. 6, p. 682-689, 2013.

VINHAL-FREITAS, I. C.; MALDONADO, A. C. D.; ALVARENGA, C. B.; CAMARGO, R.; WENDLING, B. **Adsorção e dessorção de metais no solo e**

coeficientes de isotermas de Freundlich e Langmuir. Agropecuária Técnica, v. 31, n. 2, p. 153-163, 2010.

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

WHO. World Health Organization Environmental Health Criteria 01 – **Mercury**, Geneva, 1976.

WHO. World Health Organization Environmental Health Criteria 101 – **Methylmercury**, Geneva, 1990.

WHO, IPCS, Inorganic Mercury, Environmental Health Criteria 118, WHO, Geneva, 1991, 168 p.

WILSON, J. R.; LEANG, C.; MORBY, A. P.; HOBMAN, J. L.; BROWN, N. L. **MerF is a mercury transport protein: different structures but a common mechanism for mercuric ion transporters?** FEBES Letters, v. 472, n. 1, p. 78-82, 2000.

YAGHOOBIZADEH, F.; ARDAKANI, M. R.; ZOLGHARNEIN, H. **Introducing an Efficient Mercury-Resistant Bacteria (MRB) Which Can Be Used for Bioremediation Purposes.** Journal of Applied Biological Sciences, v. 7, n. 5, p. 29-40, 2017.

ZHANG, L.; PLANAS, D. **Biotic and abiotic mercury methylation and demethylation in sediments.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 52, p. 691-698, 1994.