



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

JOSÉ DO CARMO BARBOSA NETO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Enterobacter ludwigii* E
Citrobacter freundii NA DEGRADAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS**

Recife
2024

JOSÉ DO CARMO BARBOSA NETO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Enterobacter ludwigii* E
Citrobacter freundii NA DEGRADAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de
Morais Junior

Co-orientadora: Me. Bruna Kelly de Oliveira
Silva

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Barbosa Neto, José do Carmo.

Avaliação do potencial de *Enterobacter ludwigii* e *Citrobacter freundii* na
degradação de hidrocarbonetos monoaromáticos. / José do Carmo Barbosa
Neto. - Recife, 2024.

35 p.

Orientador(a): Marcos Antônio de Moraes Junior

Coorientador(a): Bruna Kelly de Oliveira da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

1. Biorremediação. 2. Microbiologia. 3. Poluentes. I. Moraes Junior, Marcos
Antônio de . (Orientação). II. Oliveira da Silva, Bruna Kelly de. (Coorientação). IV.
Título.

570 CDD (22.ed.)

JOSÉ DO CARMO BARBOSA NETO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Enterobacter ludwigii* E
Citrobacter freundii NA DEGRADAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior
UFPE/ Departamento de genética/CB

Prof. Dr. Fabricio Motteran
UFPE/ Departamento de engenharia civil e ambiental

Me. Luiz Pereira da Silva Junior
UFPE/ Laboratório de saneamento ambiental - LSA

Dedico este trabalho ao meu avô, de quem tenho orgulho de carregar o mesmo nome. Agradeço por todos os ensinamentos, que são essenciais na minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder a sabedoria necessária para enfrentar as dificuldades e por ter me permitido realizar meu sonho. Toda honra e glória a Ele, pois, como está escrito em Romanos 11:36: "Pois dele, por ele e para ele são todas as coisas. A ele seja a glória para sempre! Amém."

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Marcos Morais e M.e. Bruna Kelly, por toda a orientação e apoio recebidos ao longo desses últimos anos. Minha gratidão se estende ao CNPq, à UFPE e a todos os pesquisadores do LGM, especialmente a Karoline Moura, Bruna Maria, Vivian Kelen, Maria Cecília e Jamerson, por cada contribuição, por menor que tenha sido, a este trabalho. Agradeço também a todos os professores do curso de graduação em Biomedicina do Centro de Biociências (CB/UFPE), que foram fundamentais na minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço profundamente aos meus familiares pelo apoio incondicional durante esta jornada, especialmente à minha mãe e minha irmã, que sempre segurou minha mão, me ajudou a enfrentar minhas inseguranças e esteve disposta a ouvir minhas dificuldades, oferecendo sempre os melhores conselhos. Obrigado, mãe, pelo seu amor e apoio constante. Minha gratidão se estende também à minha noiva, Talita, que tornou minha vida universitária mais leve e agradável. Obrigado, meu amor, por todo o seu suporte. Te amo.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos que contribuíram com a troca de conhecimentos e experiências: Gabriel Solthatos, Bruna Queiroz, João Gabriel, Letícia, João Victor, Rebhecca, e muitos outros que têm um grande significado em minha vida. Levarei todos vocês comigo em meu caminho.

NETO, José do Carmo. **Avaliação do potencial de *Enterobacter ludwigii* e *Citrobacter freundii* na degradação de hidrocarbonetos monoaromáticos.** 2024. 35 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

As Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) são habitats ricos em microorganismos com a capacidade de degradar compostos orgânicos presentes nos esgotos sanitários e industriais. Os níveis de poluentes encontrados nesses efluentes desencadeiam uma série de adaptações nos microrganismos, tornando-os capazes de metabolizar substâncias e produtos do ambiente. A ETE multifabril em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, tem demonstrado uma eficiente remoção de matéria orgânica e poluentes presentes nos efluentes que chegam às três lagoas de tratamento que compõem o sistema. Os padrões de remoção de contaminantes da ETE são adequados, pois estão em conformidade com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA Nº 430/2011. Diante disso, justifica-se a realização de análises de substâncias como os hidrocarbonetos derivados de petróleo, como Benzeno, Tolueno, Xileno e Etilbenzeno (BTEX), visando a biodegradação. Esses compostos orgânicos voláteis, frequentemente associados à indústria petroquímica, são geralmente encontrados em produtos derivados de petróleo e são utilizados como solventes industriais na síntese de diversos produtos, como plásticos, fibras sintéticas e pesticidas. As análises do lodo resultaram no isolamento de duas espécies frequentemente encontradas em ambientes aquáticos ricos em matéria orgânica e hidrocarbonetos, sendo elas: *Citrobacter freundii* e *Enterobacter ludwigii*. Levando em consideração os relatos na literatura sobre a capacidade dessas espécies de atuar em solos e águas contaminadas, realizamos uma avaliação da tolerância dessas bactérias aos hidrocarbonetos derivados de petróleo, BTEX, e a antimicrobianos. Nossos testes demonstraram a resiliência dessas espécies a esses compostos, suportando altas concentrações dos solventes no meio. Além disso, adaptam-se a fontes de carbono distintas, e mostraram sensíveis diante a presença de antimicrobianos como Gentamicina, Azitromicina, Ampicilina e Cefotaxima. Os resultados obtidos nesta pesquisa ressaltam o potencial significativo de *C. freundii* e *E. ludwigii* para aplicações voltadas a programas de biorremediação de poluentes ambientais. Além disso, a presença sustentável dessas bactérias nos efluentes da ETE multifabril da Compesa reforça sua importância no tratamento eficaz das águas residuais provenientes dessa instalação.

Palavras-chave: Poluentes; Microrganismos; Biorremediação; BTEX.

NETO, José do Carmo. **Evaluation of the potential of *Enterobacter Ludwigii* and *Citrobacter freundii* in the degradation of monoaromatic hydrocarbons.** 2024. 35 pages. Course Completion Work (Biomedicine Degree) – Federal University of Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Sewage Treatment Plants (STPs) are habitats rich in microorganisms with the ability to degrade organic compounds present in sanitary and industrial sewage. The levels of pollutants found in these effluents trigger a series of adaptations in the microorganisms, making them capable of metabolizing substances and products from the environment. The multifactory STP in Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, has demonstrated efficient removal of organic matter and pollutants present in the effluents that reach the three treatment ponds that make up the system. The STP's contaminant removal standards are adequate, as they comply with Resolution No. 430/2011 of the National Environmental Council – CONAMA. In view of this, it is justified to perform analyses of substances such as petroleum-derived hydrocarbons, such as Benzene, Toluene, Xylene and Ethylbenzene (BTEX), aiming at biodegradation. These volatile organic compounds, often associated with the petrochemical industry, are generally found in petroleum-derived products and are used as industrial solvents in the synthesis of various products, such as plastics, synthetic fibers, and pesticides. The sludge analyses resulted in the isolation of two species frequently found in aquatic environments rich in organic matter and hydrocarbons: *Citrobacter freundii* and *Enterobacter ludwigii*. Taking into account the reports in the literature on the ability of these species to act in contaminated soils and waters, we performed an evaluation of the tolerance of these bacteria to petroleum-derived hydrocarbons, BTEX, and antimicrobials. Our tests demonstrated the resilience of these species to these compounds, withstanding high concentrations of solvents in the medium. In addition, they adapt to different carbon sources and have shown sensitivity to the presence of antimicrobials such as Gentamicin, Azithromycin, Ampicillin, and Cefotaxime. The results obtained in this research highlight the significant potential of *C. freundii* and *E. ludwigii* for applications aimed at bioremediation programs of environmental pollutants. In addition, the sustainable presence of these bacteria in the effluents of Compesa's multi factory WWTP reinforces their importance in the effective treatment of wastewater from this facility.

Keywords: Pollutants; Microorganisms; Bioremediation; BTEX.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs)	10
2.2	Microrganismos extremófilos e seu potencial biotecnológico	11
2.3	BTEX e seus impactos ambientais	12
2.4	Biorremediação de xenobióticos	14
2.5	Microrganismos resistentes a antimicrobianos	15
3	OBJETIVOS	17
3.1	Objetivo geral	17
3.2	Objetivos específicos	17
4	METODOLOGIA	18
4.1	Coleta e Preparo de amostras	18
4.2	Isolamento e cultivo microbiano	18
4.3	Identificação e sequenciamento genético	19
4.4	Padronização do inóculo para as análise de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)	19
4.5	Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)	19
4.6	Fontes de carbono	20
4.7	Tolerância aos compostos BTEX	21
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	26
7	REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

As Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs) apresentam um papel importante na manutenção da saúde pública e do ambiente, desempenhando uma tarefa essencial na remoção de poluentes presentes nos efluentes sanitários antes de seu descarte nos corpos hídricos. A falta deste tratamento, representa risco à sociedade e ao meio ambiente. São as ETEs que garantem que a água residual que chega até as unidades de tratamento sejam devolvidas ao ambiente em condições seguras e em conformidade com a legislação vigente (Fernandes et al., 2020; Athaydes et al., 2020; Ermakoff et al., 2022).

Além do tratamento por meios químicos e físicos, a degradação por parte dos microrganismos também é essencial no tratamento de efluentes. Bactérias, arqueias e microalgas desempenham um papel essencial na eficiência desses processos, principalmente na degradação da matéria orgânica e de contaminantes presentes nos esgotos (Da Silva et al., 2021; Batool et al., 2021; Candido, 2024).

Geralmente, os microrganismos encontrados nas ETEs são aqueles denominados de microrganismos tolerantes. Estes microrganismos são característicos de ambientes inóspitos, locais onde temperatura, pH, salinidade e carga orgânica são considerados inadequados para muitas formas de vida. Todavia, microrganismos extremófilos têm a capacidade de adaptar-se e desenvolver uma série de mecanismos metabólicos que permitem que sobrevivam e estabeleçam comunidades nestes locais (Krasimirova, 2020; Mendéz, 2020).

A complexidade encontrada nas estações de tratamento, reflete em uma comunidade microbiana seleta e característica, com microrganismos capazes de degradar diversos compostos orgânicos de cadeia curta, longa, além de compostos aromáticos, incluindo os hidrocarbonetos. Ou seja, degradam esses compostos em moléculas mais simples, minimizando os danos ao ambiente (Gupta, 2015; de Lima et al., 2018). Dessa forma, a biodegradação através da atividade microbiana tem ganhado espaço por ser um método muito eficaz, e de custo relativamente baixo, que pode ser usado em conjunto com técnicas convencionais (Koh et al., 2022; El-naas et al., 2014).

Sempre que há discussões acerca de xenobióticos, alguns compostos recalcitrantes como o Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xilenos (BTEX) são citados. Hidrocarbonetos derivados do petróleo são de grande preocupação para o meio ambiente. Esses compostos são bastante utilizados na indústria, além disso, com frequência acabam contaminando ambientes naturais por consequência de vazamentos ou derramamento de óleo bruto (Câmara, 2016). Um dos exemplos, foi o acidente com vazamento de petróleo que atingiu 4.334 Km da costa brasileira no ano de 2019, atingindo a área litorânea de 120 municípios (Pena et al., 2021).

O meio ambiente possui uma capacidade limitada para absorver esses impactos, o que resulta em uma degradação ambiental pequena, gerando assim uma grande problemática (Turner e Renegar, 2017). Pensando em solucionar esses impactos, técnicas alternativas têm sido desenvolvidas, com destaque para a biorremediação (Amaral, 2020). O uso de consórcios microbianos na degradação de contaminantes é uma ferramenta biotecnológica válida e economicamente vantajosa. Além disso, a verificação da resistência a antimicrobianos é um ponto chave, pois é essencial que um inóculo usado para tal finalidade não apresente, nem dissemine genes de resistência a antibióticos (Abrantes, 2022; Moreira, 2021; Noguera-Oviedo & Aga, 2016).

Dessa forma é evidente que o desenvolvimento de pesquisas e tecnologias de biorremediação de baixo custo e alta eficiência, se fazem necessários, pois os efluentes industriais e domésticos que contém uma variedade de compostos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos representam um sério problema para a saúde e o

ambiente natural. Assim, esta pesquisa visou testar o potencial biotecnológico para biorremediação de dois isolados provenientes de uma ETEs multifabril, frente a compostos BTEX.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs)

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) possuem uma grande importância para as necessidades de manutenção da qualidade ambiental e da saúde pública (Castanheira et al., 2015). No qual, sua função consiste em tratar as águas residuais que contêm poluentes físicos, químicos e biológicos, antes de retornarem ao meio ambiente, evitando a poluição e a propagação de doenças (Alves & Santos, 2020; Nuvolari, 2021). Assim, o papel das ETEs visa garantir a qualidade da água e reduzir os impactos ambientais por meio de padrões aceitáveis pelos órgãos fiscalizadores (Metcalf & Eddy, 2014).

Dessa forma, as ETEs podem ser classificadas de acordo com os seus processos de funcionalidades e tratamentos, sendo eles: tratamento preliminar, e tratamentos primário, secundário e terciário (Pescara, 2014; Chiavelli et al., 2019). O tratamento preliminar, consiste no gradeamento e desarenação, tendo como finalidade a remoção de ordem física, retendo sólidos grosseiros, evitando danos aos equipamentos subsequentes. O tratamento primário, baseia-se na floculação e sedimentação, sendo responsável pela remoção de sólidos em suspensão por meio de tanques de sedimentação, utilizando o princípio da densidade das partículas, no qual é utilizado tanto para processos físicos quanto para químicos (Pereira, 2022).

Amplamente utilizado, o tratamento secundário, que consiste em processos biológicos e de oxidação, segue sendo um dos principais. Este processo utiliza a degradação da matéria orgânica, eliminando os principais poluentes dos efluentes, em um processo natural do meio ambiente. Esta degradação é realizada por microrganismos como bactérias, fungos, algas e arqueas, que são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica (El-Sheekh, 2017). Por fim, o tratamento terciário, denominado também como desinfecção, visa o polimento da água. Removendo poluentes que não foram eliminados nas etapas anteriores utilizando métodos como adsorção, filtração e nitrificação-desnitrificação (Costa, 2016; Von Sperling, 2014; ZHOU, 2022).

As ETEs também são categorizadas de acordo com o tipo de efluentes que recebe. Tem-se ETEs que tratam efluentes apenas de origem domésticas, e aqueles que tratam efluentes de origem industrial, em alguns casos, realizam o tratamento de ambos. O esgoto doméstico é aquele formado por compostos de águas residuais de banheiros, cozinhas, lavanderias, esta água residuária costuma conter matéria orgânica e nutrientes como nitrogênio e fósforo (Soares, 2018; Junior, 2020), além de patógenos e uma variedade de substâncias químicas (Marques, 2014; Bonfim et. al, 2016).

Já o esgoto de origem industrial possui em sua composição detergentes, substâncias organocloradas, derivados de petróleo, metais pesados, sendo rico também em microrganismos com capacidade de sobreviver e degradar estes compostos (Grosseli, 2016; Silva et al., 2016). Os níveis de poluentes presentes nesses efluentes desencadeiam uma série de adaptações nos microrganismos tornando-os capazes de metabolizar substâncias e produtos do meio (Giovanela, 2020; Oliart-ros et al., 2016).

Esse tipo de ETE costuma estar inserida em complexo industrial, recebendo esgoto de fábricas de diversas categorias, além de esgoto doméstico (Fernandes et al., 2020). A maioria destes efluentes contém compostos orgânicos recalcitrantes, como gorduras, hidrocarbonetos, corantes, metais, surfactantes, dentre outros

(Skariyachan et al., 2018; Mileena et al., 2023). Estes compostos bioacumulam no ambiente e representam riscos à saúde pública por serem tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (Copetti et. al, 2022).

Nesta pesquisa, foram utilizados dois isolados provenientes de uma ETE para tratamento de efluentes industriais, obtidos por meio de uma parceria entre a Companhia Pernambucana de Saneamento (COMPESA) e o projeto de pesquisa MAIDAI da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A ETE multifábrica do Jaboatão dos Guararapes (-8.106413259326699, -35.02676082084689), que está sob a parceria administrativa público-privada da Companhia de Saneamento de Pernambuco (COMPESA) e BRK ambiental. Esta ETE está inserida em um complexo industrial de aproximadamente 15 fábricas, de segmentos variados. Assim, esta unidade recebe efluentes e resíduos da fabricação de papéis, lavanderia, panificação, laticínios, ração animal, tintas, vernizes, policloreto de vinila (PVC), galvanizados, entre outros.

Estes resíduos, somados às condições físicas e químicas das lagoas de tratamento, principalmente na primeira lagoa, que consiste em baixa densidade de oxigênio dissolvido, altas temperaturas, pH ácido e alta carga orgânica, impactam diretamente as comunidades microbianas presentes nesses sistemas. Esses microrganismos são frequentemente considerados extremófilos, uma vez que conseguem sobreviver em ambientes hostis, especializando-se e formando populações adaptadas às diferentes composições de substratos ou a nichos específicos dentro dos sistemas de tratamento (Oliveira, 2017; de Lima et al., 2018).

Um ponto relevante no tratamento de efluentes é, portanto, a possibilidade de identificar populações existentes, para melhorar a capacidade de biotransformação de tecnologias evolutivamente adaptadas, reconfigurando projetos de reatores, visando utilizar essas populações em diferentes processos de estações de tratamento (Cabral, 2020; Melo, 2022). Devido às suas capacidades metabólicas e alta eficiência para a biodegradação (Pinhati, 2014).

Dessa forma, o desempenho positivo de unidades de tratamento de efluentes industriais justificam o estudo dos microrganismos presentes nestes sistemas, com a finalidade de encontrar organismos com potencial para biorremediação de compostos recalcitrantes como os BTEX (Martirena, 2016). Esses microrganismos podem ser fundamentais na otimização dos processos de degradação, apresentando-se assim como alternativas biotecnológicas promissoras nos processos tecnológicos sustentáveis para o tratamento de resíduos industriais (Saravanan et al., 2021; Kamali et al., 2019).

2.2 Microrganismos extremófilos e seu potencial biotecnológico

Os microrganismos extremófilos são organismos adaptados a ambientes que possuem condições extremas, como altos índices de radiação, salinidade, temperaturas e altos ou baixos potenciais Hidrogeniônicos (pH) (Delgado, 2021; Medeiros, 2020). Esses microrganismos, por sobreviverem em locais inóspitos, desenvolvem capacidades metabólicas e adaptativas reconhecidas cientificamente. Muitos, possuem notável capacidade de degradar compostos orgânicos, podendo vir a ser amplamente utilizados em processos biotecnológicos (Emiliani et al., 2018; Krasimirova, 2020; Oliart-Ros et al., 2016).

Esses microrganismos, já adaptados a ambientes contaminados, são bastante relatados na literatura no que diz respeito à degradação de derivados de petróleo e metais pesados, além de atuarem na recuperação de locais contaminados (Álamo, 2016; Rivera et al., 2019). Em ambientes dulcícolas e marinhos, microrganismos como as microalgas, que são organismos microscópicos aquáticos, desempenham um papel importante. Elas possuem uma estrutura celular variada, englobando tanto espécies eucarióticas quanto procarióticas (Dias et al., 2019). Esses microrganismos são

propostos como uma solução eficaz, pois reduzem nutrientes como nitratos e fosfatos, além de metais pesados tóxicos, e podem ser utilizados na produção de biocombustíveis a partir de sua biomassa (Mathew et al., 2022).

Assim, microalgas e bactérias são alternativas sustentáveis para o tratamento de águas residuais em relação aos métodos convencionais (Ahmad, 2022), que produzem grandes quantidades de lodo de baixa qualidade e consomem muita energia para a aeração. A interação entre microalgas e bactérias é destacada, porque as microalgas utilizam o dióxido de carbono produzido pelas bactérias na decomposição de matéria orgânica, enquanto as bactérias aeróbicas usam o oxigênio gerado pelas algas na fotossíntese (Ramanan, 2016). Essa cooperação melhora a eficiência na remoção de nutrientes da água. Tecnologias como os Tanques de Algas de Alta Taxa (HRAPs) foram desenvolvidas para otimizar o processo, reduzindo o consumo de energia e o impacto ambiental em relação aos métodos tradicionais (Mathew et al., 2022).

Outros organismos microscópicos, como arqueias, são microrganismos procarióticos que, assim como as bactérias, desempenham papéis importantes em processos de tratamento de efluentes (Da rocha, 2020). Esses organismos se destacam principalmente por sua capacidade de sobreviver em condições extremas, como altas temperaturas, salinidade e pH variado, o que torna algumas espécies de arqueias ideais para o tratamento de resíduos industriais complexos (Carvalho, 2016). Na literatura encontram-se relatos acerca do seu potencial em utilizar contaminantes como fontes de carbono, reduzindo os poluentes dos locais aos quais estão inseridas, através de um processo de nitrificação anaeróbica por meio de oxidação do metano (DAMO - *Denitrifying Anaerobic Methane Oxidation*) (Ding, 2021; Li et al., 2018).

Já as bactérias, presentes em ETEs são amplamente prospectadas para o tratamento de efluentes, tanto domésticos, quanto industriais. Como exemplos de microrganismos utilizados nesses processos estão *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sp.*, *Micrococcus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Streptomyces sp.*, *Nocardia sp.*, *Vibrio sp.*, entre outros. Estes microrganismos são citados para o tratamento de hidrocarbonetos de cadeia longa e curta (Pinhati, 2014).

Um estudo recente demonstrou que os gêneros *Citrobacter* e *Enterobacter* foram capazes de degradar o petróleo bruto em águas contaminadas (Fahim, 2023). *Citrobacter freundii* também demonstrou potencial para produzir biossurfactantes que oferecem uma alternativa ecológica aos métodos convencionais de remediação, como precipitação química e adsorção (Goma, 2019). Além disso, por possuir um caráter comensal, *Enterobacter ludwigii* é constantemente isolada de rizosferas de plantas como o arroz. Shoebitz (2009) destacou em seu artigo a capacidade de biocontrole da espécie frente a fungos como *Fusarium solani*, antagonizando o mesmo. A espécie ainda atua na promoção do crescimento vegetal, sendo também associada a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Shoebitz et al., 2009; Pau-Roblot et al., 2013; Lee et al., 2019).

2.3 BTEX e seu impactos ambientais

Os hidrocarbonetos monoaromáticos derivados de petróleo mais conhecidos são: Benzeno, Tolueno, Xileno e Etilbenzeno (BTEX). Tratam-se de compostos orgânicos voláteis, comumente associados à indústria petroquímica e que geralmente estão presentes em derivados de petróleo, sendo utilizados como solventes industriais para síntese de diversos produtos, como plástico, fibras sintéticas, tintas, solventes e pesticidas. Os compostos BTEX (Figura 1), são estruturalmente semelhantes, com anéis de benzeno que diferem em suas substituições laterais, determinando sua toxicidade e comportamento ambiental. Sendo a queima de combustíveis fósseis a principal fonte de emissão do BTEX (Badzinski, 2018).

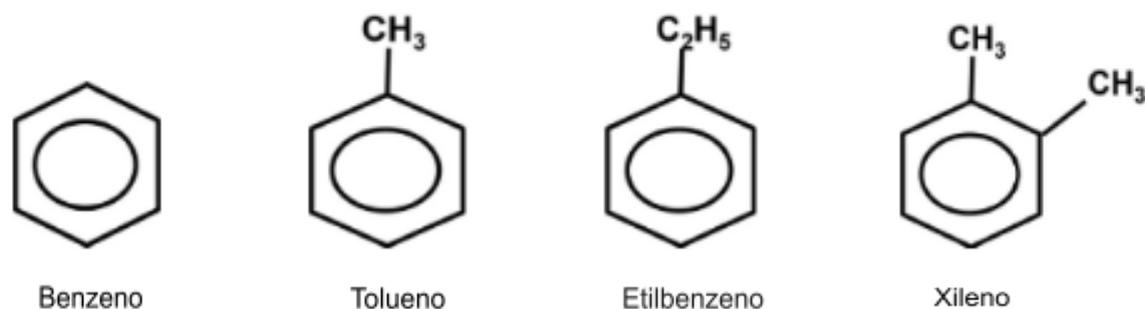


Figura 1. Estrutura química do BTEX. Fonte: Adaptado de El-Naas et al. (2014).

Esses compostos estão entre as principais referências de contaminantes ambientais dos últimos anos, chegando a se destacar na lista de poluentes prioritários da agência de proteção ambiental norte-americana, a *United States Environmental Protection Agency* (US EPA) devido ao seu elevado potencial carcinogênico e mutagênico. Os BTEX possuem relativamente alta solubilidade em água, podendo contaminar extensivamente solos e aquíferos subterrâneos, o que pode comprometer corpos hídricos e fontes de água potável, representando um sério problema ambiental e de saúde pública (Dou et al., 2022).

Apesar da relevância das atividades relacionadas ao petróleo, estas são responsáveis por inúmeros acidentes e danos ao meio ambiente. Em 2000, ocorreu um grave acidente ambiental na Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro, quando uma tubulação da Refinaria Duque de Caxias (Reduc), operada pela Petrobras, rompeu, liberando aproximadamente 1,3 milhões de litros de óleo cru nas águas. O vazamento se espalhou por mais de 40 km², causando contaminação significativa da água, praias e ilhas próximas, como as ilhas do Governador e Paquetá. Esse incidente resultou em graves consequências para o ecossistema local, afetando a fauna, a flora e gerando grandes prejuízos econômicos e sociais para a população (Ciotti, 2009).

Em 30 de agosto de 2019, ocorreu o derramamento de petróleo bruto, o qual foi o maior desastre ambiental dessa natureza na história do Brasil e um dos mais extensos registrados no mundo. O óleo se espalhou por 4.334 km da costa brasileira, afetando 11 estados das regiões Nordeste e Sudeste, desde o Maranhão até o Rio de Janeiro. Até o dia 22 de novembro de 2019, 120 municípios e 724 localidades foram atingidos, o incidente resultou na remoção de 5.379,76 toneladas de óleo das praias (Pena, 2020).

A extensão do derramamento de óleo neste evento causou danos imensuráveis na fauna, ocasionando a morte de tartarugas, peixes, aves, algas e animais filtradores, como mexilhões. Além de afetar áreas de proteção ambiental, como o Parque Nacional de Abrolhos (Magris et al., 2020). A contaminação dessas áreas pelo petróleo levou à proibição da pesca, a fim de evitar que a população fosse contaminada pelas substâncias tóxicas que poderiam ter bioacumulado nos organismos, o que poderia vir a gerar danos à saúde das pessoas que consumissem pescados ou outras fontes de proteínas contaminadas (Carmo e Teixeira, 2020).

A exposição aos hidrocarbonetos está associada a uma série de efeitos adversos tanto para o ambiente e a saúde humana. O Benzeno, um dos componentes do BTEX é um composto altamente tóxico e classificado como cancerígeno pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC). Devido a sua relevância toxicológica, danosas à saúde humana, como síndromes mielodisplásicas (SMD) e, principalmente, ao seu efeito carcinogênico, como

leucemia mieloide aguda (LMA). Já o Tolueno, Xileno e Etilbenzeno são menos tóxicos que o Benzeno, todavia a sua exposição pode causar efeitos adversos no sistema nervoso central levando à fadiga, confusão e danos neurológicos permanentes (Amaral et al., 2017).

Assim, a contaminação ambiental por BTEX é particularmente problemática devido à sua volatilidade e capacidade de infiltrar-se em águas subterrâneas e solos, tornando-se uma fonte persistente de poluição (Ferreira, 2020). A presença de BTEX em águas subterrâneas representa um risco significativo, já que muitos desses compostos são relativamente solúveis em água e podem ser transportados a grandes distâncias, contaminando fontes de água potável (Bulatović et al., 2022; Powers et al., 2001).

Tendo em vista os efeitos nocivos dos BTEX no ambiente e em organismos vivos, torna-se urgente o desenvolvimento de metodologias eficientes e capazes de minimizar sua presença no meio. As técnicas de combustão e condensação são técnicas convencionais de tratamento, que sofrem vários inconvenientes, incluindo alto capital, custos de operação e manutenção, alto consumo de energia e produção de subprodutos tóxicos. Atualmente se aposta em processos de tratamento biológico, como a biorremediação, que utiliza a capacidade natural de microorganismo para degradar poluentes em produtos menos nocivos (Câmara, 2016; Alves, 2014).

2.4 Biorremediação de xenobióticos

Os xenobióticos são compostos químicos que não são produzidos naturalmente por um organismo ou que não são obtidos em um ambiente específico. Esses compostos têm a capacidade de interagir de forma nociva no metabolismo de seres vivos, tanto a curto, como a longo prazo (Mesquita, 2023). A presença desses compostos representa um desafio significativo para a saúde ambiental e humana, pois podem causar toxicidade, bioacumulação e resistência em organismos. Esses compostos estão associados a uma variedade de doenças cancerígenas e teratogênicas, causando lesões à órgãos, além de disfunção reprodutiva e endócrina (Fernandez, 2017; André, 2017; Cardeal, 2017; Von Sperling, 2014).

Os hidrocarbonetos, são um exemplo de xenobióticos. Pois apresentam baixa biodegradabilidade e alta persistência no ambiente, resultando em impactos ambientais significativos. Nesse contexto, a biorremediação se destaca por sua eficiência e custo-benefício em comparação a métodos convencionais de remediação, contribuindo para a redução dos impactos ambientais (Sandu et al., 2017). Esses processos não apenas reduzem os efeitos adversos dos poluentes, mas também promovem a sustentabilidade, tornando a biorremediação uma estratégia eficaz no combate à contaminação (Silva, 2017).

A biorremediação surgiu como uma alternativa promissora para a recuperação de locais contaminados por poluentes orgânicos (Morais, 2016). Para que o processo seja eficaz, é essencial a presença de microrganismos capazes de realizar reações químicas necessárias para a degradação dos compostos. Além disso, os contaminantes devem estar acessíveis a esses microrganismos ou às enzimas que produzem (Barcellos, 2021). Assim, as tecnologias de biorremediação utilizam microrganismos para aproveitar sua diversidade metabólica, transformando compostos tóxicos em substâncias menos nocivas como CO₂, água e sais inorgânicos (Pereira, 2015). Assim, estes microrganismos utilizam esses contaminantes como fonte de energia e geração de biomassa.

Essas tecnologias de biorremediação podem ser realizadas *in situ* ou *ex situ* em condições aeróbias, ou anaeróbias que são amplamente empregadas na limpeza de poluentes recalcitrantes, como hidrocarbonetos aromáticos (Da Costa, 2023). A biorremediação *in situ* acontece quando o contaminante pode ser tratado no próprio local, conhecida como tecnologia a longo prazo. Já a biorremediação *ex situ* envolve a

remoção física do material contaminado, geralmente solos ou sedimentos, seguem por tratamentos sob condições controladas em *landfarming*, biorreatores e biopilhas (Francisco, 2018). Essa técnica foi utilizada com sucesso no tratamento de água contaminada com hidrocarbonetos monoaromáticos através de reator biológico anaeróbico (Siqueira, 2018). Além dos três principais processos de biorremediação que são: atenuação natural, bioestimulação e bioaumentação (Figura 2) (Candido, 2024).

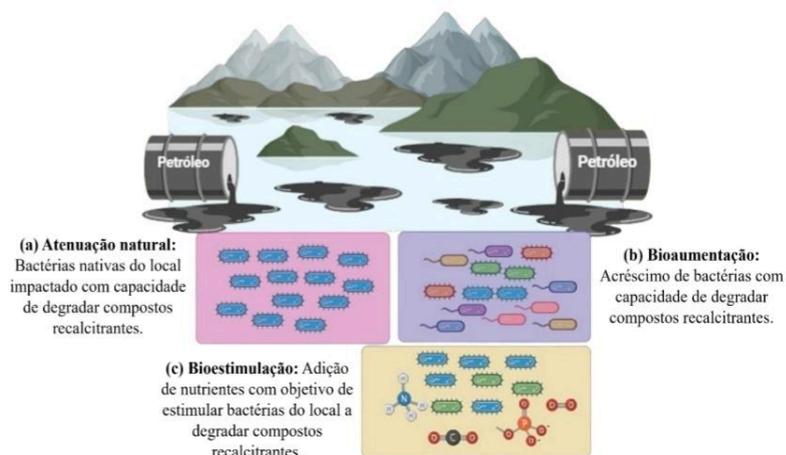


Figura 2. Processos de biorremediação (Candido, 2024).

Para ocorrer a biorremediação faz necessário a utilização de microrganismos principalmente as bactérias, pois, destacam-se nesse tipo de processo devido a sua capacidade de metabolizar substâncias que são prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana, como hidrocarbonetos, fenóis e compostos orgânicos voláteis (Chinellato, 2023). Assim, existem vários tipos de microrganismos que têm a capacidade de biorremediar contaminantes, atuando de maneira eficaz nos processos de remediação. No entanto, alguns gêneros de bactérias se destacam mais, como: *C. freundii*, um estudo de biodegradação observou que essa cepa foi capaz de degradar 94,3% de Benzeno na concentração de 5 ppm, seguida de 67,08% e 51,3% nas concentrações de 10 e 25 ppm, respectivamente (Gupta, 2015). Além dos gêneros *Pseudomonas* (Kaczorek et al., 2012), *Acinetobacter* (Fondi et al., 2013) e *Bacillus* (Amer, 2015).

A biorremediação para a remoção de BTEX do ambiente é crucial, pois trata-se de uma metodologia eficiente na degradação desses compostos, utilizando microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos. Esses microrganismos podem acumular, degradar ou transformar poluentes ambientais. No entanto, é importante estar alerta para a resistência a fármacos que essas bactérias, com grande potencial biotecnológico podem conter. Muitas delas podem carregar genes de resistência, o que pode resultar na disseminação indesejada desses genes, principalmente os genes de resistência a antimicrobianos (Cunningham, 2020).

2.5 Microrganismos resistentes a antimicrobianos

Os microrganismos isolados das ETEs têm ganhado destaque biotecnológico, especialmente para uso na biorremediação, produção de biocombustíveis e também de enzimas. Todavia, as ETEs recebem diariamente esgoto bruto contendo resíduos de antimicrobianos e outros fármacos presentes nas águas residuais, o que deixa as comunidades microbianas das lagoas expostas a essas drogas. Apesar de todo tratamento que ocorre nas ETEs, esta exposição aos medicamentos podem gerar nos microrganismos a formação de genes de resistência (Abrantes, 2022;

Noguera-Oviedo, 2016; Aga, 2016; Pandis et al., 2022; Cherobim, 2017).

A presença desses fármacos nas águas residuárias cria uma pressão seletiva que promove o crescimento de bactérias mais resistentes devido à transferência horizontal de genes, permitindo a propagação de determinados genes de resistência antimicrobiana dentro das comunidades bacterianas. Dessa forma, a resistência aos antibióticos apresenta sérios desafios, uma vez que essas bactérias resistentes podem comprometer os processos industriais, a segurança ambiental, a saúde pública e o seu uso como potenciais biorremediadores (Perry, 2018; Auguet et al., 2024).

Assim, a fim de obter segurança em relação aos processos biotecnológicos, precisa-se de responsabilidade na escolha dos microrganismos, pois, faz-se necessário que as bactérias utilizadas para fins de biorremediação não apresentem genes de resistência a antibióticos (Gutierrez, 2019; Abrantes et al., 2022). É essencial que os microrganismos utilizados para esta finalidade sejam sensíveis aos antimicrobianos, o que reduz o risco de disseminação de resistência e contaminação cruzada (Moreira et al., 2022).

Além disso, microrganismos não resistentes são mais adequados para processos biotecnológicos, uma vez que as normas de segurança ambiental e de saúde exigem frequentemente o uso de cepas seguras e livres de resistência. Pois, o uso contínuo de microrganismos resistentes em ambientes industriais pode agravar o problema de resistência, levando à ineficácia de tratamentos com antibióticos em humanos e animais. Assim, a seleção de microrganismos sem esses genes é essencial para mitigar esse impacto a longo prazo (Martínez, 2008). Dessa forma, entende-se que os isolados envolvidos em qualquer linha de pesquisa para fins de biorremediação, além de serem tolerantes aos compostos testes, e ter potencial para degradá-los, precisam antes de tudo, ser sensíveis aos antimicrobianos (Abrantes et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial das cepas *C. freundii* e *E. ludwigii*, isoladas de efluentes de uma ETE multifabril, em relação a sua resistência a antibióticos, tolerância aos compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) e crescimento em diferentes fontes de carbono.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a taxa de crescimento das espécies *C. freundii* e *E. ludwigii* por meio da curva de crescimento;
2. Analisar a utilização de diferentes fontes de carbono pelas cepas;
3. Avaliar o grau de tolerância dos isolados frente aos compostos BTEX, visando seu potencial biotecnológico para a biorremediação;
4. Investigar a resistência das cepas a diferentes classes de antibióticos.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e Preparo de Amostras

No presente estudo, foram utilizadas cepas de *C. freundii* e *E. ludwigii*, isoladas de uma Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) multifabril localizada em Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco (-8.106413259326699, -35.02676082084689). A ETE multifabril é composta por três lagoas: uma anaeróbia e duas facultativas, todas com 2 metros de profundidade. Foram selecionados 12 pontos de coleta distribuídos ao longo dessas lagoas, para a coleta de amostras de efluentes, representando uma abrangência espacial da área de tratamento (Figura 3). As amostras foram coletadas utilizando frascos estéreis em cada um dos 12 pontos previamente estabelecidos. As amostras foram transportadas em caixas térmicas até o laboratório para processamento imediato.



Figura 3. ETE multifabril do Jaboatão dos Guararapes com demarcação dos 12 pontos de coleta. (Fonte: Autor)

4.2 Isolamento e cultivo microbiano

Para o isolamento microbiano, foi realizada uma combinação contendo porções equivalentes das amostras dos 12 pontos foi preparado para representar o conjunto de microrganismos presentes na ETE. Foram realizadas diluições seriadas da combinação, partindo de 1 mL da amostra misturada em 9 mL de solução salina estéril (NaCl) a 0,9%, em tubos de fundo cônico de 15 mL. As diluições foram realizadas até a concentração de 10^5 , visando reduzir a densidade de unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL), facilitando o isolamento de colônias individuais.

Após as diluições seriadas, 100 μ L das duas últimas diluições (10^4 e 10^5) foram plaqueados em superfície em placas de ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), utilizando alça de *Drigalski* para espalhar o inóculo uniformemente. O plaqueamento foi realizado em duplicata para garantir a repetibilidade dos resultados. As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas, permitindo o crescimento das colônias.

Após o período de incubação, foram selecionadas colônias isoladas e bem definidas. As colônias passaram por diluição seriada e plaqueamento em novas placas contendo BHI, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Este segundo cultivo foi realizado com o objetivo de eliminar qualquer potencial contaminação,

visando obter isolados representativos das espécies de interesse.

4.3 Identificação e sequenciamento genético

Para a identificação dos microrganismos isolados, inicialmente realizou-se a coloração de Gram, seguida da observação morfológica utilizando microscopia óptica. Este procedimento permitiu uma avaliação preliminar da morfologia das cepas isoladas. Após a observação microscópica, optamos pela extração do DNA para uma identificação mais precisa por meio de sequenciamento genético. As cepas isoladas da água residuária foram submetidas à extração de DNA com o objetivo de amplificar a região do gene ribossomal 16S, um marcador molecular amplamente utilizado para identificação bacteriana. A extração de DNA foi realizada utilizando o protocolo de fenol quente, proposto pela

O DNA extraído foi posteriormente purificado utilizando o *Kit Wizard PCR Clean-up* (PROMEGA), garantindo a remoção de possíveis impurezas e contaminações. Para a amplificação da porção 16S do RNA ribossomal, foram utilizados os primers universais 27F e 1093R, que são amplamente empregados em estudos de taxonomia bacteriana. A amostra de DNA amplificada foi padronizada e enviada para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.4 Padronização do inóculo para a análise de Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

Para a preparação dos inóculos utilizados neste teste, foram realizados o repique das cepas de *C. freundii* e *E. ludwigii* em placas de Petri contendo ágar BHI. As placas foram incubadas a 37 ± 2 °C por 18-24 horas. Após a incubação, com auxílio de uma alça de platina, retiraram-se colônias isoladas e bem definidas para incorporar em um tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina a 0,9%. O tubo foi agitado por 30 segundos. A absorbância foi considerada como aceita se apresentar valores entre 0.8 nm a 0.13 nm.

4.5 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB)

A determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi realizada a fim de avaliar o perfil de resistência das cepas de *C. freundii* e *E. ludwigii*. O método utilizado foi a microdiluição em caldo BHI. Com a preparação de placas de microtitulação de 96 poços de fundo em "U". Nos poços da primeira coluna foram adicionados 125 µL de caldo BHI e 10 µL do antibiótico a ser testado. Nas colunas 2 a 10 foram adicionados 100 µL de caldo BHI, enquanto a coluna 11 serviu como controle negativo, foram adicionados 90 µL de caldo BHI e 10 µL do solvente utilizado na diluição do antibiótico. A coluna 12 foi reservada como controle de esterilidade do meio, contendo apenas 100 µL de meio de cultura (Figura 4).

Para *E. ludwigii*, foram testados os antibióticos gentamicina (GEN), ampicilina (AMP), cefalotina (CEF) e azitromicina (AZI). Para *C. freundii* foram utilizados cefotaxima (CTX), imipenem (IMP), gentamicina (GEN) e ampicilina (AMP). As diluições seriadas dos antibióticos foram realizadas nas colunas 1 a 9, começando com uma concentração inicial de 1000 µg/mL até 3,9 µg/mL. Os poços da coluna 10 serviram como controle positivo, contendo 100 µL de caldo BHI e 10 µL do inóculo bacteriano. O inóculo bacteriano foi padronizado a uma concentração de 10^6 UFC/mL e 10 µL deste inóculo foi adicionado em todos os poços das colunas 1 a 11. As placas foram então incubadas a 37 ± 2 °C por 18-24 horas, em seguida as placas foram

submetidas a leitura da densidade óptica (DO) através de um espectrofotômetro a 625 nm, para verificação do crescimento bacteriano. Dessa forma, a avaliação da CMI foi realizada através do método de microdiluição em placas multipoços, proposto pelo Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2017).

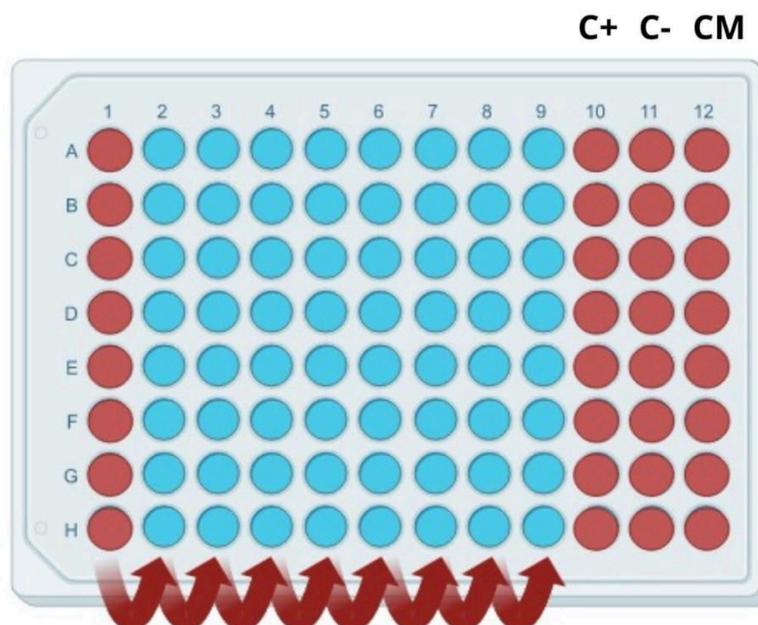


Figura 4. Preparação de placa de microtitulação de 96 poços de fundo em “U”(Fonte: Elaborado pelo próprio autor pelo BioRender 2024)

Após a incubação, alguns poços específicos foram plaqueados para determinação da Concentração Mínima Bactericida (CMB) para verificar a capacidade dos antibióticos de matar 99,9% dos microrganismos. Para isso, os poços que apresentaram inibição total do crescimento foram selecionados e o conteúdo foi retirado com uma alça de platina calibrada (10 μ L), sendo plaqueado em meio ágar BHI em placas de Petri. As placas de Petri foram incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24 horas. A CMB foi definida como a menor concentração de antibiótico que reduziu em 99,9% a população bacteriana, evidenciada pela ausência de crescimento nas placas de ágar após o período de incubação.

Após o devido plaqueamento, foram aplicados 20 μ L do corante resazurina a 0,1% em cada poço. As placas foram incubadas por mais 1 a 2 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ para que a mudança de cor pudesse ser observada. A resazurina atua como um indicador de oxirredução: na presença de oxigênio, sua cor se torna rosa, enquanto na ausência dela, adquire uma coloração roxa. Dessa forma, a resazurina pode ser utilizada para avaliar a atividade metabólica, pois muda de azul para rosa na presença de crescimento bacteriano. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração de antibiótico capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano, evidenciada pela ausência de mudança de cor nos poços.

4.6 Fontes de Carbono

As cepas bacterianas foram mantidas e cultivadas em meio BHI a 37°C para o crescimento geral. Para os experimentos subsequentes, foram utilizados dois tipos de meios: um meio mineral e caldo nutritivo. O meio mineral foi composto por CaCl_2 (0,0074 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,463 g/L), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,01 g/L), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02 g/L), $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0,0197 g/L), KH_2PO_4 (0,5 g/L), K_2HPO_4 (0,5 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5 g/L) e NaCl (9 g/L). Para os experimentos de crescimento em diferentes fontes de carbono, o meio mineral foi suplementado com peptona (2 g/L), ou substituído por sacarose (2 g/L) ou glicose (2 g/L) conforme necessário.

O caldo nutritivo foi composto por peptona (5 g/L), extrato de carne (5 g/L) e extrato de levedura (5 g/L). Para avaliar o crescimento nas fontes de carbono no caldo nutritivo, foi utilizada glicose (10 g/L) ou hidrolisado de cana-de-açúcar (10 g/L), cedido pelo Grupo de Pesquisa em Energia da Biomassa, Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

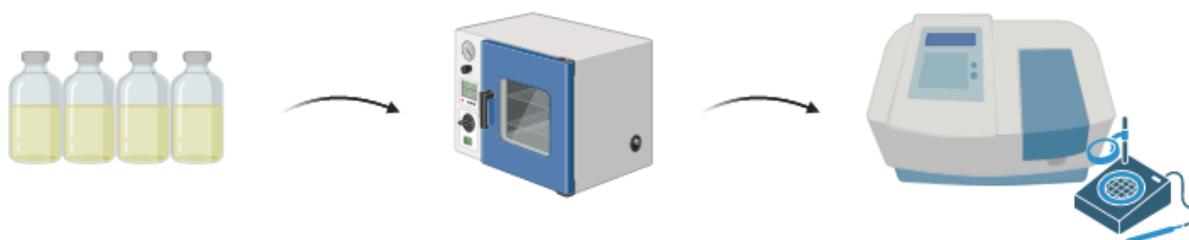


Figura 4. Preparação dos isolados para variadas fontes de carbono (Fonte: Elaborado pelo próprio autor pelo BioRender 2024)

Os isolados bacterianos foram submetidos a diluição seriada em solução salina a 0,9% até 10^{-3} , e 100 μL de cada inóculo foram adicionados a frascos de penicilina contendo 30 mL dos respectivos meios: BHI, meio mineral com peptona (MMP), meio mineral com sacarose (MMS), meio mineral com glicose (MMG), caldo nutritivo com glicose (CNG) e caldo nutritivo com hidrolisado de cana-de-açúcar (CNH). Os frascos foram incubados a 37°C , e as medições de crescimento bacteriano foram realizadas através da leitura da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 625 nm, nos tempos de 0h, 1h, 2h, 3h e 24h. O experimento foi realizado em duplicata para cada isolado (Figura 5).

4.7 Tolerância aos compostos BTEX

Os isolados obtidos foram submetidos a um teste de tolerância aos compostos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos) utilizando quatro concentrações: 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L e 200 mg/L. Essas concentrações foram determinadas com base em relatos da literatura e nas concentrações de BTEX encontradas na natureza, conforme descrito por Martiarena (2016). O experimento foi conduzido em frascos de penicilina de 50 mL, contendo 30 mL de meio mineral (MM), 100 μL de inóculo do isolado de lodo e as concentrações especificadas de BTEX. Os frascos foram incubados a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Após o período de incubação, retirou-se 100 μL de cada frasco, os quais foram diluídos até 10^{-2} , e então, realizou-se o semeio em superfície em placas de Petri contendo meio mineral. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As culturas que apresentaram mais de 30 Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL) foram consideradas tolerantes aos compostos BTEX. Além disso, 2mL de cada frasco foram utilizados para medir a absorbância em espectrofotômetro a 625 nm, após incubação a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Duas espécies de bactérias foram obtidas a partir de amostras da água residuária da ETE multifabril do Jaboatão dos Guararapes. O sequenciamento do DNA total destes isolados, identificou as espécies *Enterobacter ludwigii* e *Citrobacter freundii* (Figura 4). *C. freundii* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, está disposta em forma de bastonete e é também está enquadrada no grupo de coliformes total dentro do saneamento ambiental. Esta espécie pertence ao gênero *Citrobacter*, família *Enterobacteriaceae*, ordem *Enterobacteriales*, classe *Gammaproteobacteria*, filo *Proteobacteria* e domínio *Bacteria* (Ibrahim, 2018; Li et al., 2014).

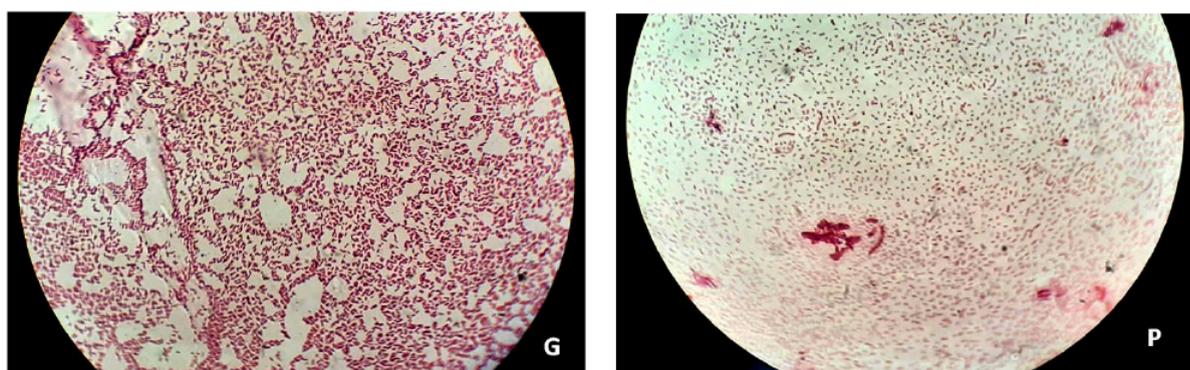


Figura 6. Imagem de microscopia dos isolados do efluente na objetiva de 100X de aumento, onde (G) é *E. ludwigii* e (P) é *C. freundii*.

C. freundii pode ser encontrada em amostras de solo ou água, mas também estão presentes em humanos ou animais, sendo considerada um patógeno oportunista, estando muito associada a doenças nosocomiais (Liu et al., 2018). Em nossa pesquisa, testamos a resistência das cepas aos antibióticos de primeira escolha para o tratamento de cada uma delas. *C. freundii* apresentou sensibilidade alta aos fármacos cefotaxima (CMI e CMB < 3,9 µg/mL), uma cefalosporina de terceira geração, muito eficiente no tratamento de infecções causadas por Gram-negativos, trata-se de um antibiótico beta-lactâmico de amplo espectro (Jiménez-Guerra et al., 2016).

C. freundii também apresentou alta sensibilidade à gentamicina (CMI e CMB < 3,9 µg/mL), um antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos (Mestre et al., 2023). A espécie também apresentou moderada sensibilidade a ampicilina (CMI e CMB 250 µg/mL), um antibiótico beta-lactâmico semi-sintético (Machado et al., 2020). O isolado apresentou certa resistência ao imipenem (CMI e CMB > 1.000 µg/mL), um antibiótico beta-lactâmico sintético, pertencente à classe dos carbapenêmicos (Zhanel et al., 2018).

E. ludwigii também apresentou alta sensibilidade à gentamicina (CMI e CMB < 3,9 µg/mL) e a *azitromicina* (CMI e CMB 7,8 µg/mL). A azitromicina é um antibiótico da classe dos macrolídeos (Freires et al., 2022). *E. ludwigii* apresentou moderada sensibilidade à ampicilina (CMI e CMB 500 µg/mL), e resistência à cefalexina (CMI e CMB > 1.000 µg/mL). A cefalexina é um antibiótico beta-lactâmico, pertencente à primeira geração de cefalosporinas (Lourenço, 2021).

A resistência de *E. ludwigii* para este antibiótico em questão, pode estar atrelado ao fato de que ele é mais específico para bactérias Gram-positivas, contemplando apenas algumas bactérias Gram-negativas (Sfaciotte et al., 2014). Apesar dos nossos isolados terem mostrado-se resistentes à concentração de 1.000 µg/mL para a cefalexina e o imipenem, as cepas mostraram-se igualmente sensíveis aos demais antimicrobianos testes, o que demonstra uma vantagem para a sua

aplicação.

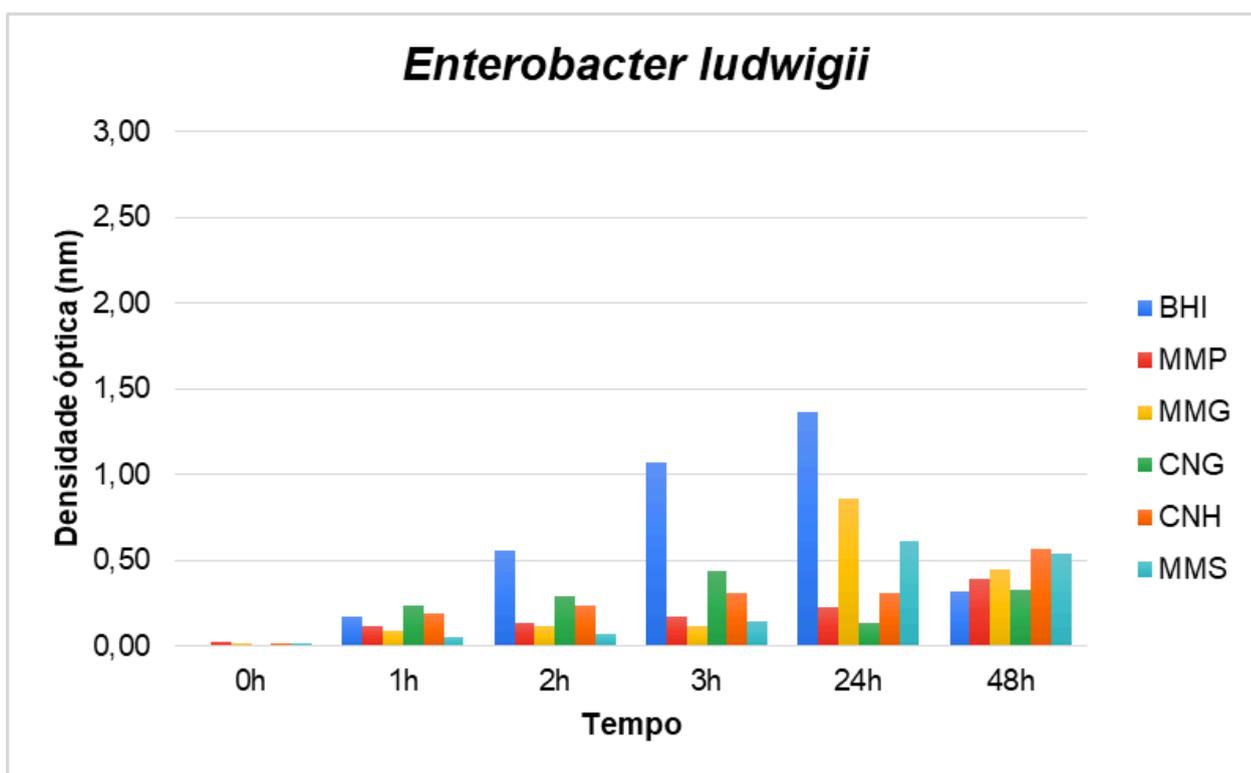
E. ludwigii pertence à mesma classificação taxonômica de *C. freundii*, distinguindo-se apenas no gênero, que neste caso é o *Enterobacter*. Também são consideradas patógenos oportunistas, podendo ser encontradas em uma diversidade de amostras humanas, animais e ambientais. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa, e que juntamente com a *C. freundii*, está muito associada ao trato gastrointestinal do homem (Lee et al., 2019; Tandon et al., 2018). O fato destas bactérias terem sido isoladas de uma ETE que recebe efluentes industriais, está ligado ao fato de que estas estações recebem também esgotos domésticos advindos dos banheiros destas indústrias.

Apesar desta associação às doenças infecciosas, estas bactérias possuem notável valor biotecnológico (Li et al., 2015; Ibrahim, 2016). *E. ludwigii* é constantemente isolada de rizosferas de plantas como o arroz, e possui a interessante capacidade de causar um efeito sinérgico ao fungo *Fusarium solani*, esta ação de biocontrole ajuda na promoção do crescimento desses vegetais. Além disso, esta espécie está associada a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (Shoebitz et al., 2009; Pau-Roblot et al., 2013; Lee et al., 2019).

C. freundii também possui notável potencial na degradação de compostos como o Benzeno (Gupta, 2015). Relatos como esses enfatizam o quanto esses isolados provenientes da ETE multifábrica são importantes. Nossa pesquisa também avaliou a capacidade de crescimento dos isolados em quatro concentrações de BTEX diferentes, que foram 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L e 200 mg/L. Além disso, o crescimento dos isolados foi testado em alguns meios e fontes de carbono distintas, que foram, meio mineral com peptona (MMP), meio mineral com glicose (MMG), meio mineral com sacarose (MMS), caldo nutriente com glicose (CNG), caldo nutriente com hidrolisado de cana-de-açúcar (CNH) e meio *brain heart infusion* (BHI).

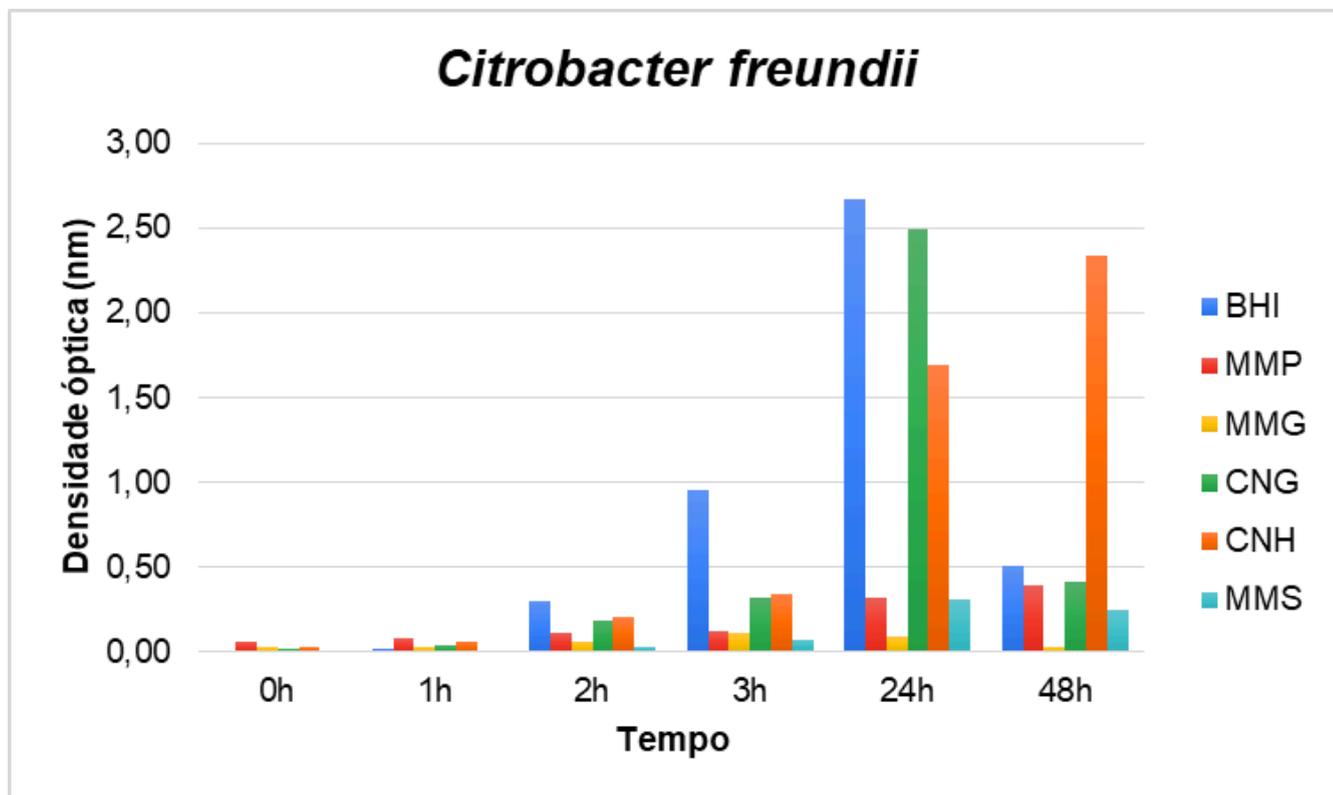
Analisando o crescimento em fontes de carbono distintas temos os gráficos a seguir (Figuras 7 e 8):

Figura 7. Crescimento de *E. ludwigii* em fontes de carbono distintas



Legenda: brain heart infusion (BHI), meio mineral com peptona (MMP), meio mineral com glicose (MMG), caldo nutriente com glicose (CNG), caldo nutriente com hidrolisado de cana-de-açúcar (CNH) e meio mineral com sacarose (MMS).

Figura 8. Crescimento de *C. freundii* em fontes de carbono distintas



Legenda: brain heart infusion (BHI), meio mineral com peptona (MMP), meio mineral com glicose (MMG), caldo nutricional com glicose (CNG), caldo nutricional com hidrolisado de cana-de-açúcar (CNH) e meio mineral com sacarose (MMS).

Ao analisar o crescimento de *E. ludwigii* no gráfico 1, nota-se que este isolado teve preferência pelo BHI, consumindo os nutrientes presentes no meio em apenas 24h, isso mostra que este meio de cultura acelerou o metabolismo deste isolado, fazendo-o alcançar a sua fase exponencial de forma rápida. Ao analisar o meio MMG para *E. ludwigii*, vê-se que ele comporta-se de maneira contrária ao BHI. Por sua vez, o MMG, faz com que o crescimento de *E. ludwigii* seja lento, apresentando o seu pico de crescimento apenas com 24h. Os meios MMG, MMP e MMS comportam-se de maneira semelhante para o isolado, com crescimento lento e constante, isso pode estar relacionado a disposição de macro e micronutrientes disponíveis na base deste meio de cultura.

O crescimento de *C. freundii* (gráfico 2), é bem diferente do apresentado por *E. ludwigii*. O isolado em questão possui uma fase lag maior, apresentando um crescimento considerável com 3h de cultivo. Ao olhar o eixo y, nota-se que o *C. freundii* exibiu uma absorvância bem mais elevada do que *E. ludwigii*. Além disso, *C. freundii* apontou preferência aos meios BHI e também CNG e CNH, contrastando com *E. ludwigii*.

Quanto a tolerância aos compostos BTEX nas concentrações de 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L e 200 mg/L em meios distintos, aqueles que no plaqueamento com 48h de cultivo apresentassem acima de 30 UFC/mL eram consideradas tolerantes para os compostos testes. Deste modo obtemos os seguintes resultados:

Para *E. ludwigii*:

- BHI (BTEX 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L > de 30 UFC/mL; BTEX 200 mg/L não houve crescimento);
- CNH, CNH, MMP, MMG e MMS (BTEX 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L e 200 mg/mL > de 30 UFC/mL).

Para *C. freundii*:

- Apresentou acima de 30 UFC/mL em todas as concentrações de BTEX e em todos os meios testados.

Os dois isolados da ETE multifábrica demonstraram ser tolerantes a concentrações que vão de 50 a 200 mg/mL do composto BTEX. Apesar da preferência de cada cepa por fontes de carbonos específicas, e embora o crescimento de ambos aconteçam em tempos distintos, ao final das 48 horas de incubação, todas mostraram-se tolerantes ao composto. O que é interessante e animador, uma vez que as concentrações de BTEX na natureza não costumam ultrapassar os 200 mg/mL (Martarena, 2016).

Compreendendo todo o contexto, e listando todos os pontos positivos, que vão desde a adaptação dos isolados a diferentes fontes de carbono, a sua tolerância a concentrações distintas de BTEX e a sua sensibilidade a quase todos os antimicrobianos testados nesta pesquisa, ainda comparando com o potencial descrito na literatura para as mesmas, conclui-se que *E. ludwigii* e *C. freundii* possuem alto apelo biotecnológico. Estes isolados provaram ter todas as características necessárias para integrar futuras pesquisas no âmbito da biorremediação e degradação de xenobióticos, como os BTEX.

6. CONCLUSÃO

A avaliação das fontes de carbono demonstrou que ambas as cepas, *C. freundii* e *E. ludwigii*, são capazes de metabolizar uma variedade de fontes de carbono. Essa descoberta é um fator-chave a ser destacado porque evidencia o potencial dessas espécies em ambientes contaminados por vários compostos. Ou seja, demonstra que essas espécies podem ser exploradas em sistemas industriais onde a diversidade de contaminantes é um desafio constante.

Os testes de tolerância aos compostos BTEX indicaram alta capacidade das cepas de *C. freundii* e *E. ludwigii* de resistir a esses compostos tóxicos. Portanto, ambas são candidatas promissoras para uso em biorremediação de ambientes contaminados por derivados de petróleo, proporcionando um efeito de baixo custo e eficiente para redução de contaminantes ambientais.

Além disso, a investigação da resistência aos antibióticos revelou que ambas as cepas apresentam um perfil de resistência considerável, especialmente para antibióticos comumente utilizados. Esta descoberta é importante para garantir a segurança da utilização dessas cepas em processos biotecnológicos, uma vez que a ampla disseminação de genes de resistência em ambientes naturais pode resultar em problemas sérios de saúde pública e regulamentação para o manejo dos microrganismos em processos industriais.

7. REFERÊNCIAS

ABRANTES, J. A. **Avaliação da resistência bacteriana em Estações de Tratamento de Esgoto da Fiocruz com ênfase no perfil fenotípico e molecular para beta-lactamases em enterobactérias.** Tese. Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente Fiocruz, Rio de Janeiro, Fiocruz, 2022.

AHMAD, A. Biotecnologia de algas para tratamento de águas residuais industriais, produção de bioenergia e bioprodutos de alto valor. **Science of The Total Environment**, v. 806, 2022.

ÁLAMO MORENO, Thaney Betsabé. **Caracterización del medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos extremófilos anaerobios fermentativos aplicables en la industria petrolera.** 2016.

ALVES, EDNA; DOS SANTOS, MARIA. **AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO LANÇAMENTO DO EFLUENTE DE UMA ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO NO RIO CUIÁ.** 2020.

ALVES, Shari Liliana Machado. **Contribuição para o estudo do tratamento de águas residuais provenientes da indústria de extração de petróleo.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade Nova de Lisboa.

AMARAL, Isabele Campos Costa et al. Avaliação ambiental de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, p. e8s, 2017.

AMARAL, Viviane; LACERDA, Felipe; NAVONI, Julio. **A biorremediação: educação em saúde e alternativas à poluição ambiental.** 2020.

AMER, Ranya A. et al. Bacterial Diversity and Bioremediation Potential of the Highly Contaminated Marine Sediments at El-Max District (Egypt, Mediterranean Sea). **BioMed Research International**, v. 2015, n. 1, p. 981829, 2015.

ANJOS, José Ângelo Sebastião Araújo dos. Fitorremediação de solos contaminados por derramamento de petróleo. **Geologia ambiental e médica do estado da Bahia: avaliação de impactos ambientais (AIA): Volume 1-Licenciamento e Estudos Ambientais**, 2021.

AUGUET, Olga et al. Sewers as potential reservoirs of antibiotic resistance. **Science of the Total Environment**, v. 605, p. 1047-1054, 2017.

ATHAYDES, Tiago Vinicius Silva; PAROLIN, Mauro; DE QUEIROZ CRISPIM, Jefferso n. Análise histórica sobre práticas de saneamento básico no mundo. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, v. 8, n. 65, 2020.

BADZINSKI, Caroline. **Potencial de atenuação natural de diesel (B8) e biodiesel (B100) em latossolo vermelho sem histórico de contaminação.** 2018.

BARCELLOS, Letícia Gonçalves. Controle microbiológico da água: potencial das análises de sólidos totais dissolvidos e condutividade elétrica como métodos auxiliares

no monitoramento da degradação da qualidade da água. **Repositório Institucional Pantheon**, 2021.

BATTOOL, Afshan et al. Isolamento e triagem de bactérias resistentes ao cromo de resíduos industriais para fins de biorremediação. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e242536, 2021.

Bonfim, J. H., Silva, L. G. D., Gavazza, S., Florencio, L., & Kato, M., T. (2016). Remoção de alquilbenzeno linear sulfonado em esgoto doméstico tratado em reator UASB e lagoa de polimento. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, 21(2), 397-406.

BULATOVIĆ, Sandra et al. Avaliação de riscos potenciais à saúde humana pela exposição a compostos orgânicos voláteis em águas subterrâneas urbanas contaminadas no aquífero do rio Sava, Belgrado, Sérvia. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 44, n. 10, p. 3451-3472, 2022.

CABRAL, Cássia et al. **Estratégias operacionais em biorreatores para pós-tratamento de efluente anaeróbio: ênfase na remoção de metano, sulfeto e nitrogênio amoniacal**. 2020.

CÂNDIDO, Manoella Almeida. **Isolamento e enriquecimento de micro-organismos para processos de biorremediação de fenantreno provenientes de óleo bruto**. 2024. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

CARMO, Eduardo Hage; TEIXEIRA, Maria Gloria. Desastres tecnológicos e emergências de saúde pública: o caso do derramamento de óleo no litoral do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 2, p. e00234419, 2020.

CARVALHO, José Roberto Santo de. **Ecologia microbiana de reatores UASB submetidos a diferentes condições de operação para tratar efluente têxtil**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

CÂMARA, Jéssica Maria Damião de Arruda. **Análise da biorremediação de compostos monoaromáticos em água através da Pseudomonas aeruginosa**. 2016. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CASTANHEIRA, João PA; BAYDUM, Valderice PA. Percepção dos Impactos Socioambientais da Estação de Tratamento de Esgotos (ETE) Relatados pelos Moradores do Residencial Olho d'Água, Jaboatão dos Guararapes, PE. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, n. 03, p. 876-887, 2015.

CHANDRA, Ram; SAXENA, Gaurav; KUMAR, Vineet. Phytoremediation of environmental pollutants: an eco-sustainable green technology to environmental management. **Advances in biodegradation and bioremediation of industrial waste**, p. 1-29, 2015.

CHEROBIM, Ana Luiza et al. **Multirresistência de Escherichia Coli a antibióticos: uma avaliação da qualidade microbiológica da água de reservatórios urbanos da região metropolitana de Curitiba**. 2017.

CHIAVELLI, Henrique Gabriel Rovigatti et al. Etapas de um sistema de tratamento de efluente e processos convencionais de tratamento: uma revisão de literatura. In: **IX Congresso Brasileiro de Engenharia de Produção**. 2019.

CHINELLATO, Roberta Alves Merguizo. Avaliação do potencial de biorremediação de diesel S10 e de espuma para controle de incêndio (AFFF) por bactérias heterotróficas isoladas de sedimentos do Estuário de Santos-SP. 2023.

CIOTTI, Carla Simone et al. Acidente ecológico na Baía de Guanabara: o direito ambiental e a tragédia envolvendo sua sustentabilidade. **Encontro de sustentabilidade em projeto do Vale do Itajaí**, v. 3, p. 1-8, 2009.

COSTA, Luma Soares. **Tratamento de efluentes primário e secundário da indústria de carnes com microalgas**. 2016.

COPETTI, Camila Morizzo et al. Biorremediação: metodologia sustentável na remoção de xenobióticos da água. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e29811931978-29811931978, 2022.

CUNNINGHAM, Colin J. et al. Potential risks of antibiotic resistant bacteria and genes in bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 5, p. 1110-1124, 2020.

DA COSTA QUEIROZ, Taciana. Métodos eficientes para remediação de Dinitrotoluenos (DNT) em solos e corpos hídricos. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 11, n. 2, 2023.

DA SILVA, Vinícius Carvalho et al. O POTENCIAL DA BIORREMEDIAÇÃO BASEADA EM MICROALGAS PARA O TRATAMENTO DE EFLUENTES CONTAMINADOS: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SISTEMÁTICA. **Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 3, p. 19-19, 2021.

DA ROCHA, Maria Carolina Vieira. **Microbiologia ambiental**. Editora Intersaberes, 2020.

DE ARAÚJO, Sidney; BORGES, Aline Rocha. Fitorremediação como tecnologia sustentável no tratamento de efluentes industriais. **Scientific Journal ANAP**, v. 1, n. 6, 2023.

DE LIMA CAETANO, Marília et al. ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS RESISTENTES A FORMALDEÍDO PROVENIENTES DE LODO DE ESTAÇÃO DE TRATAMENTO DE ESGOTO (ETE): RESULTADOS PRELIMINARES. **Anais da Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI)-e-ISSN 2316-7165**, v. 1, n. 11, p. 1-5, 2018.

DELGADO ROMERO, José A. **Microorganismos extremófilos. Vida microbiana más allá de sus condiciones óptimas**. 2021.

DIAS, Guilherme et al. Biorremediação de efluentes por meio da aplicação de microalgas-uma revisão. **Química Nova**, v. 42, p. 891-899, 2019.

DING, Jing; ZENG, Raymond Jianxiong. Fundamentals and potential environmental significance of denitrifying anaerobic methane oxidizing archaea. **Science of the Total Environment**, v. 757, p. 143928, 2021.

EL-NAAS, Muftah H.; ACIO, Janice A.; EL TELIB, Ayat E. Aerobic biodegradation of BTEX: progresses and prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, n. 2, p. 1104-1122, 2014.

EL-SHEEKH, Mostafa M.; MAHMOUD, Yehia AG. Technological approach of bioremediation using microbial tools: bacteria, fungi, and algae. In: **Handbook of research on inventive bioremediation techniques**. IGI Global, 2017. p. 134-154.

EMILIANI, Anyela Vanessa Velásquez et al. Microorganismos marinos extremófilos con potencial en bioprospección. **Revista de la Facultad de Ciencias**, v. 7, n. 2, p. 9-43, 2018.

ERMAKOFF, Eduardo Delmont et al. Novo marco legal do saneamento: mapeamento da demanda industrial. 2022.

FAHIM MUHSIN, K.; ABOKSOUR, M. F.; HADI, S. Bioremediation by bacteria isolated from water contaminated with hydrocarbons. **Revis Bionatura**, v. 8, n. 3, p. 94, 2023.

FERNANDES, Carlos Eduardo et al. Saneamento Ambiental: Os desafios da estação de tratamento de esgoto do DAIA em Anápolis (GO). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 42426-42436, 2020.

FERREIRA, Natália Vitória Ramos. **Avaliação do estado ambiental dos solos na envolvente de uma unidade industrial**. 2020.

FONDI, Marco et al. The genome sequence of the hydrocarbon-degrading *Acinetobacter venetianus* VE-C3. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 5, p. 439-449, 2013.

FRANCISCO, Wellington Camilo; QUEIROZ, Tânia Márcia de. BIORREMEDIAÇÃO. **Nucleus (16786602)**, v. 15, n. 1, 2018.

FREIRES, Marinete Sousa; JUNIOR, Omero Martins Rodrigues. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado da azitromicina frente a Covid-19: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e31611125035-e31611125035, 2022.

GIOVANELLA, Patrícia et al. Biorremediação de poluentes metálicos e orgânicos por microrganismos extremófilos. **Journal of dangerous materials**, v. 382, p. 121024, 2020.

GOMA, Eman Z.; EL-MEIHY, Rasha M. Biossurfactante bacteriano de *Citrobacter freundii* MG812314. 1 como uma ferramenta de bioremoção de metais pesados de águas residuais. **Boletim do National Research Centre**, v. 43, p. 1-14, 2019.

GUPTA, Shalini; PATHAK, Bhawana; FULEKAR, M. H. Molecular approaches for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 14, p. 241-269, 2015.

GUTIERREZ, Karent Jurleyd Romero. **Diversidade genética e fisiológica de *Burkholderia* spp. isoladas de diferentes hospedeiros**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GROSSELLI, Guilherme Martins. **Contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto aeróbia e anaeróbia**. 2016.

IBRAHIM, Haytham MM. Biodegradação de óleo de motor usado por novas cepas de *Ochrobactrum anthropi* HM-1 e *Citrobacter freundii* HM-2 isoladas de solo contaminado com óleo. **3 Biotech** , v. 6, n. 2, p. 226, 2016.

IBRAHIM, Haytham MM. Caracterização de biossurfactantes produzidos por novas cepas de *Ochrobactrum anthropi* HM-1 e *Citrobacter freundii* HM-2 a partir de solo contaminado com óleo de motor usado. **Egyptian Journal of Petroleum** , v. 27, n. 1, p. 21-29, 2018.

JIMÉNEZ-GUERRA, Gemma et al. Método rápido para detecção de sensibilidade à cefotaxima em enterobactérias. **Revista Argentina de Microbiología** , v. 48, n. 4, pág. 320-324, 2016.

JUNIOR, Geovane Gregório Mesquita. Estudo da perda de carga em filtros de areias usados no pós-tratamento de esgoto doméstico: estudo de caso ETE Mangueira (Pernambuco). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 8, n. 3, 2020.

KACZOREK, Ewa et al. Cell surface properties of *Pseudomonas stutzeri* in the process of diesel oil biodegradation. **Biotechnology letters**, v. 34, p. 857-862, 2012.

KAMALI, Mohammadreza et al. Considerações de sustentabilidade em tecnologias baseadas em membranas para tratamento de efluentes industriais. **Chemical Engineering Journal** , v. 368, p. 474-494, 2019.

KOH, Lai Mun; KHOR, Sook Mei. Current state and future prospects of sensors for evaluating polymer biodegradability and sensors made from biodegradable polymers: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1217, p. 339989, 2022.

KRASIMIROVA MILOVA, Lyudmila. **Los microorganismos extremófilos y sus aplicaciones biotecnológicas**. 2020.

LEE, Ko-Eun et al. **Isolamento e caracterização da nova cepa *Enterobacter ludwigii* GAK2 altamente solubilizante de silicato e fosfato que promove o crescimento em plantas de arroz**. *Agronomia* , v. 9, n. 3, pág. 144, 2019.

LEMOS, Judith Liliana Solórzano et al. **Revisão acerca da utilização de microorganismos na biorremediação de rejeitos industriais contando metais pesados**. 2008.

LI, Baohua et al. Oxidação anaeróbica de ferro (II) dependente de nitrato por uma nova bactéria autotrófica, *Citrobacter freundii* cepa PXL1. **Geomicrobiology Journal** , v. 31, n. 2, p. 138-144, 2014.

LI, Baohua et al. Redução anaeróbica de nitrato com oxidação de Fe (II) pela cepa PXL1 de *Citrobacter Freundii*—um candidato potencial para remoção simultânea de As e nitrato de águas subterrâneas. **Ecological engineering** , v. 77, p. 196-201, 2015.

LIRONG, DOU et al. Análise da situação mundial da exploração de petróleo e gás em 2021. **Petroleum Exploration and Development** , v. 49, n. 5, p. 1195-1209, 2022.

LOURENÇO, Cecília. **Análise de subprodutos de degradação forçada do antibiótico cefalexina**. 2021.

MACHADO, Elayne Cristina et al. Detecção e quantificação de bactérias resistentes aos antibióticos ampicilina e cloranfenicol em estações de tratamento de esgoto doméstico. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 25, p. 847-857, 2020.

MAGRIS, R.A.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 153, 10.1016/j.marpolbul. 2020.

MARQUES, Ana Cláudia Ferreira. VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS NO PROCESSO DE COMPOSTAGEM DO LODO DE ESGOTO DOMÉSTICO. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais**, v. 2, n. 2, 2014.

MARTIARENA, Maria Jesus Sutta. **Avaliação da degradação bacteriana do BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) na presença de MTBE (metil ter butil eter) e etanol**. 2016.

MARTÍNEZ, José L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 365-367, 2008.

MATHEW, M. M. et al. Biological approaches integrating algae and bacteria for the degradation of wastewater contaminants-A review. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 801051, 2021.

MELO, Thalles Araújo. **Análise da estação de tratamento de esgoto do município de Pimenta-MG**. 2022.

MÉNDEZ, Alma Sofía Reyes et al. Géneros Bacterianos Extremófilos con Potencial Aplicación Biotecnológica: Caso de Estudio. **JÓVENES EN LA CIENCIA**, v. 8, p. 1-6, 2020.

MESTRE, Maria Masmiquel; MARTÍNEZ, Tamara Ovejero. Tratamiento con gentamicina aplicada localmente en úlceras infectadas de pie diabético. Una revisión sistemática. **Academic Journal of Health Sciences: Medicina Balear**, v. 38, n. 2, p. 64-72, 2023.

METCALF, Leonard; EDDY, Harrison P. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. McGraw Hill Brasil, 2015.

MORAIS FILHO, Manuel Capristânio; CORIOLANO, Ana Catarina Fernandes. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **Holos**, v. 7, p. 133-150, 2016.

MOREIRA, Elizandra Ribeiro Bueno et al. **Prospecção de Bactérias da Antártica Tolerantes à Baixas Temperaturas, Caracterização da Virulência e Resistência a Antibióticos**. 2021. Dissertação de Mestrado.

MOREIRA, Thaís Costa et al. **Avaliação da diversidade bacteriana e do resistoma microbiano em efluentes de sistemas de tratamento alternativo e convencional**. 2022. Tese de Doutorado.

MORENO, Mileena et al. **Aplicação de ultrafiltração por melhoramento micelar na remoção de compostos orgânicos solúveis presentes em água produzida de plataformas de extração de óleo e gás**. 2023.

NOGUERA-OVIEDO, Katia; AGA, Diana S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of hazardous materials**, v. 316, p. 242-251, 2016.

NUVOLARI, Ariovaldo. **Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola**. Editora Blucher, 2021.

OLIART-ROS, Rosa María; MANRESA-PRESAS, Ángeles; SÁNCHEZ-OTERO, María Guadalupe. Utilización de microorganismos de ambientes extremos y sus productos en el desarrollo biotecnológico. **CienciaUAT**, v. 11, n. 1, p. 79-90, 2016.

OLIVEIRA, Maribel Santos Roque de. **Estudo da comunidade fitoplanctônica da lagoa facultativa do módulo III da estação de tratamento de esgotos Mangabeira (João Pessoa-PB)**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PAU-ROBLOT, Corinne et al. Características estruturais e atividade de biorremediação de um exopolissacarídeo produzido por uma cepa de *Enterobacter ludwigii* isolada na zona de exclusão de Chernobyl. **Polímeros de carboidratos**, v. 93, n. 1, pág. 154-162, 2013.

PANDIS, Pavlos K. et al. Key points of advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater, organic pollutants and pharmaceutical waste treatment: A mini review. **ChemEngineering**, v. 6, n. 1, p. 8, 2022.

PENA, Paulo Gilvane Lopes et al. Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. **Cadernos de saúde pública**, v. 36, p. e00231019, 2020.

PEREIRA, Ricardo Emanuel Fortuna. **Efluentes da indústria de curtumes: estudo de alternativas de tratamento**. 2022. Tese de Doutorado.

PEREIRA, FRANCISCO SÁVIO GOMES. Processos Químicos. **Instituto Federal de Educação, ciência e tecnologia de Pernambuco (IFPE)**. Ipojuca, 2015.

PERRY, M. R. et al. **Focussing on resistance to front-line drugs is the most effective way to combat the antimicrobial resistance crisis**. 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1101/498329>>.

PESCARA, Igor Cardoso. **Ocorrência e remoção de contaminantes emergentes por tratamentos convencionais de água e esgoto**. 2014. Tese de Doutorado. [sn].

PINHATI, Fernanda R. et al. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Química Nova**, v. 37, p. 1269-1274, 2014.

POWERS, Susan E. et al. O transporte e o destino do etanol e BTEX em águas subterrâneas contaminadas por gasohol. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 79-123, 2001.

RAMANAN, Rishiram et al. Algae–bacteria interactions: evolution, ecology and emerging applications. **Biotechnology advances**, v. 34, n. 1, p. 14-29, 2016.

RIVERA, Miguel A. Hernández; MORALES, Marcia E. Ojeda; MORALES, Arturo Martínez. Recuperación Mejorada de petróleo asistida por Microorganismos con

capacidade de sintetizar Biosurfactantes. **Emerging Trends in Education**, v. 5, n. 15, p. 5, 2019.

SANDU, Ciprian et al. Electrokinetic oxidant soil flushing: a solution for in situ remediation of hydrocarbons polluted soils. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 1-8, 2017.

SARAVANAN, A. et al. Metodologias eficazes de tratamento de água/águas residuais para remoção de poluentes tóxicos: Processos e aplicações para o desenvolvimento sustentável. **Chemosphere**, v. 280, p. 130595, 2021.

SKARIYACHAN, Sinosh et al. Degradação aprimorada de polímeros de polietileno e polipropileno por novos consórcios termofílicos de *Brevibacillus* sps. e *Aneurinibacillus* sp. selecionados de aterros sanitários de gerenciamento de resíduos e estações de tratamento de esgoto. **Polymer Degradation and Stability**, v. 149, p. 52-68, 2018.

SFACIOTTE, R. A. P.; VIGNOTO, V. K. C. WOSIACKI, S. R. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados bacterianos de afecções clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Maringá. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 29-38, 2014.

SILVA, Maria Aparecida M. et al. Production of biosurfactants by *Pseudomonas* species for application in the petroleum industry. **Water Environment Research**, v. 89, n. 2, p. 117-126, 2017.

SILVA, Tiago J. da et al. Fitorremediação de solos contaminados com metais: Panorama atual e perspectivas de uso de espécies florestais. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, p. 18-34, 2019.

SILVA, Rogério F. et al. Identificação e quantificação de contaminantes emergentes em estações de tratamento de esgoto. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 702-715, 2016.

SIQUEIRA, João Paulo da Silva. **Estudo da biorremediação Ex situ de águas doces e salobras contaminadas com hidrocarbonetos aromáticos por meio de reatores microaeróbios**. 2018.

SOARES, David Marques. **Esgoto doméstico na bacia do Alto Rio Doce**. 2018.

SHOEBITZ, Maurício et al. Propriedades promotoras do crescimento vegetal de uma cepa de *Enterobacter ludwigii* isolada da rizosfera de *Lolium perenne*. **Biologia e Bioquímica do Solo**, v. 41, n. 9, pág. 1768-1774, 2009.

TANDON, Mona et al. Cepa de *Enterobacter ludwigii* IF2SW-B4 isolada para produção de bio-hidrogênio a partir de farelo de arroz e farelo de arroz desoleificado. **Tecnologia e inovação ambiental**, v. 10, p. 345-354, 2018.

TURNER, Nicholas R.; RENEGAR, D. Abigail. Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, n. 2, p. 1-16, 2017.

VON SPERLING, Marcos **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Universidade Federal de Minas Gerais, 4ª Ed., Belo Horizonte, 2014.

ZHANEL, George G. et al. Imipenem–relebactam e meropenem–vaborbactam: duas novas combinações de inibidores de carbapenem- β -lactamase. **Drugs** , v. 78, p. 65-98, 2018.

ZHOU, Qi et al. Simultaneous biological removal of nitrogen and phosphorus from secondary effluent of wastewater treatment plants by advanced treatment: A review. **Chemosphere**, v. 296, p. 134054, 2022.