



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Departamento de Antibióticos
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DNA RECOMBINANTE EM *Escherichia coli* PARA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS MONOAROMÁTICOS (BTEX)

MESTRANDO: Ruan Matheus Freitas de Souza

ORIENTADOR: Fabrício Motteran

Recife
2024

RUAN MATHEUS FREITAS DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DNA RECOMBINANTE EM *Escherichia coli* PARA
BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS MONOAROMÁTICOS (BTEX)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre (a) em Biotecnologia. Área de Concentração: Processos de Biorremediação

Orientador (a): Prof.(a) Dr. Fabrício Motteran

Recife
2024

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Souza, Ruan Matheus Freitas de.

Utilização da técnica de DNA recombinante em *Escherichia coli* para biodegradação de compostos monoaromáticos (BTEX) / Ruan Matheus Freitas de Souza. - Recife, 2024.

82f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

Orientação: Fabricio Motteran.

Inclui referências.

1. Biorremediação; 2. recombinação genética; 3. engenharia metabólica; 4. *Escherichia coli*; 5. *Pseudomonas aeruginosa*; 6. *Enterobacter ludwigii*. I. Motteran, Fabricio. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

RUAN MATHEUS FREITAS DE SOUZA

**UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DNA RECOMBINANTE EM *ESCHERICHIA COLI*
PARA BIODEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS MONOAROMÁTICOS (BTEX)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Recife, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Processos de Biorremediação.

Aprovado em: 31/10/2024.

BANCA EXAMINADORA

(Assinado digitalmente em 28/11/2024 12:02)
FABRICIO MOTTERAN
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEPECA (11.65.60)
Matricula: ###414#1

Prof^a. Dr^a. Fabricio Motteran (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

(Assinado digitalmente em 28/11/2024 12:36)
JORGE LUIZ SILVEIRA SONEGO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DANT (11.84.51)
Matricula: ###003#3

Prof. Dr. Jorge Luiz Silveira Sonogo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

(Assinado digitalmente em 28/11/2024 13:31)
WANDERLI ROGERIO MOREIRA LEITE
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEPECA (11.65.60)
Matricula: ###049#0

Prof. Dr. Wanderli Rogerio Moreira Leite (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Visualize o documento original em <http://sipac.ufpe.br/documentos/> informando seu número: **603**, ano: **2024**, tipo: **ATA DE APROVACAO**, data de emissão: **28/11/2024** e o código de verificação: **312504ddc7**

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade do Mestrado no Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, estendo a todos os professores do programa pelo conhecimento e experiências passadas.

Agradecimento especial ao professor Fabrício Motteran por todo o suporte e disponibilidade durante todas as fases do curso e pesquisa.

Também aos meus pais, familiares, amigos e namorada por todo apoio em todos os momentos necessários, sem eles nada disso seria possível.

Agradecimento especial também à Fundação de Amparo à Ciências e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de suporte financeiro para a pesquisa.

RESUMO

Devido ao aumento do uso produtos derivados do petróleo, compostos aromáticos como benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno (BTEX) e outros hidrocarbonetos poliaromáticos (HPA) se tornam um risco cada vez mais elevado, podendo causar graves danos ambientais e também a saúde humana principalmente por suas características de bioacumulação e biomagnificação, o presente trabalho tinha como objetivo alterar *Escherichia coli* geneticamente para torna-la capaz de degradar BTEX e também aumentar a eficiência de degradação, com isso foi realizada a inserção de dois genes, um para cada vetor pET28a específico de *Escherichia coli*, o gene *todC2* é responsável por inserir duas hidroxilas nos carbonos 1 e 2 do anel aromático do tolueno através da enzima tolueno 1,2 dioxygenase e o gene *xylE* responsável por expressar a enzima 2,3 dioxygenase, sendo essa capaz de quebrar o anel aromático da molécula de catecol, após montagem das células recombinantes com os vetores, foram expostas a reatores em triplicada com meio de cultura e concentrações de 50mg/L, 100mg/L e 150mg/L em análise quantitativa e qualitativa por meio de cromatografia líquida, bem como comparação com *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter ludwigii*, foi constatado que todas as espécies conseguem crescer nas três concentrações de BTEX, apesar de que quanto maior a concentração maior o tempo necessário para as cepas começarem a crescer, além disso a cepa de *Escherichia coli* com os plasmídeos foi mais eficiente na degradação dos compostos, com o aumento na concentração a eficiência de degradação foi maior que as cepas testadas, a velocidade de redução do composto nos biorreatores foi consideravelmente maior e a taxa residual dos compostos nos reatores também foi bem menor que as outras espécies utilizadas no estudo, bem como o controle positivo de *Escherichia coli* sem a inserção dos plasmídeos chegando a valores de até 30 vezes menos nos resíduos dos compostos, bem como velocidades de degradação até 70% maiores que o controle positivo.

Palavras-chave: Biorremediação, recombinação genética, engenharia metabólica, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter ludwigii*, derivados de petróleo.

ABSTRACT

Due to the increased use of petroleum-derived products, aromatic compounds such as benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX), and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have become an increasingly elevated risk, potentially causing severe environmental damage and harm to human health, mainly due to their bioaccumulation and biomagnification characteristics. This study aimed to genetically modify *Escherichia coli* to enable it to degrade BTEX and also to enhance degradation efficiency. This was achieved by inserting two genes, one for each pET28a vector specific to *Escherichia coli*. The *todC2* gene is responsible for adding two hydroxyl groups to carbons 1 and 2 of the aromatic ring of toluene through the enzyme toluene 1,2-dioxygenase, and the *xyIE* gene is responsible for expressing the enzyme 2,3-dioxygenase, which can cleave the aromatic ring of the catechol molecule. After assembling the recombinant cells with the vectors, they were exposed to triplicated reactors with culture medium and concentrations of 50mg/L, 100mg/L, and 150mg/L in quantitative and qualitative analysis using liquid chromatography, as well as comparisons with *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter ludwigii*. It was found that all species can grow at the three BTEX concentrations, although higher concentrations required more time for the strains to start growing. Additionally, the strain of *Escherichia coli* with plasmids was more efficient in degrading the compounds, and the increase in concentration resulted in greater degradation efficiency than the tested strains. The rate of reduction of the compounds in the bioreactors was considerably higher, and the residual rate of the compounds in the reactors was also much lower than the other species used in the study, as well as the positive control of *Escherichia coli* without the plasmid insertion, reaching values up to 30 times less in the residues of the compounds and degradation rates up to 70% higher than the positive control.

Keywords: Bioremediation, genetic recombination, metabolic engineering, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter ludwigii*, petroleum derivatives.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura físico-química dos BTEX.	18
Figura 2. Estrutura química e física de alguns dos HPA mais estudados.	19
Figura 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio ágar cetrimida com cor verde fluorescente.	27
Figura 4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em meio BHI com colônias de cor branca.	27
Figura 5. <i>Enterobacter ludwigii</i> em meio Ágar BHI com colônias de cor branca.	28
Figura 6. Reatores biológicos, volume e concentração de solução.	30
Figura 7. Filtro de seringa de 0,22µm de Celulose.	32
Figura 8. Inserção das hidroxilas no tolueno, por meio da enzima tolueno 1,2 dioxygenase, sintetizada pelo gene <i>todC2</i>	36
Figura 9. Quebra do anel aromático do catechol, por meio da enzima catechol 2,3 dioxygenase sintetizada pelo gene <i>dmpB</i>	36
Figura 10. Design do plasmídeo responsável pelo gene <i>todC2</i>	37
Figura 11. Design do plasmídeo responsável pelo gene <i>dmpB</i>	38
Figura 12 Colônias de <i>Escherichia coli</i> transformadas com o plasmídeo pET28A_ <i>todC2</i>	39
Figura 13 Colônias de <i>Escherichia coli</i> transformadas com o plasmídeo pET28A_ <i>dmbP</i>	39
Figura 14. Reatores biológicos de crescimento em duplicata contendo <i>Escherichia coli</i> transformada para cada plasmídeo e meio com 80µL de solução estoque de 50 µL/mL de canamicina.	39
Figura 15. Reatores biológicoss contendo <i>Escherichia coli</i> transformada, ETMK- Controle Meio e Inóculo, ET50 – Inóculo e meio com 50mg/L de BTEX e 80 µL de 50 µL/mL de Canamicina.	40
Figura 16. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Benzeno.	43
Figura 17. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Tolueno.	44
Figura 18. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Etil-Benzeno.	44
Figura 19. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Xileno.	45
Figura 20. Curva analítica dos hidrocarbonetos aromáticos (BTEX) em HPLC.	45
Figura 21. Crescimento de <i>Escherichia coli</i> , na qual EC- 50: <i>E. coli</i> , 50mg/L de BTEX. EC- 100: <i>E. coli</i> , 100mg/L de BTEX. EC- 150: <i>E. coli</i> , 150mg/L de BTEX. EC- Con: <i>E. coli</i> e Meio de Cultura sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.	47
Figura 22. Crescimento de <i>Enterobacter ludwigii</i> , ENT- 50: <i>E. ludwigii</i> e 50mg/L de BTEX. ENT- 100: <i>E. ludwigii</i> , 100mg/L de BTEX. ENT- 150: <i>E. ludwigii</i> , 150mg/L de BTEX. ENT- Con: <i>E. ludwigii</i> e Meio de Cultura Sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.	49
Figura 23. Crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , na qual PSD- 50: <i>P. aeruginosa</i> , 50mg/L de BTEX. PSD- 100: <i>P. aeruginosa</i> , 100mg/L de BTEX. PSD-150: <i>P. aeruginosa</i> , 50mg/L de BTEX. PSD- Con: <i>P. aeruginosa</i> sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.	51

Figura 24. Crescimento de Escherichia coli. ECT- 50: E. coli transformada, 50mg/L de BTEX. ECT-100: E. coli transformada, 100mg/L de BTEX. EC- 150: E. coli transformada, 150mg/L de BTEX. ECT- Con: E. coli transformada e Meio de Cultura sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.	53
Figura 25. Degradação do Benzeno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).	56
Figura 26. Degradação do Tolueno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).	59
Figura 27. Degradação do Etil-Benzeno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).	62
Figura 28. Degradação do Xileno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros dos BTEXs.	17
Tabela 2. Tempo de retenção dos BTEX em minutos.	33
Tabela 3. Volumes necessários para curva de calibração de BTEX para cada concentração.....	33
Tabela 4. Parâmetros para análise de BTEX em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).	42
Tabela 5. Valores de área para cada concentração de BTEX.	43
Tabela 6. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.	48
Tabela 7. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.	50
Tabela 8. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.	52
Tabela 9. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.	54
Tabela 10. Reatores biológicos com Benzeno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A_1 = velocidade de remoção do composto.....	58
Tabela 11. Reatores biológicos com Tolueno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A_1 = velocidade de remoção do composto.....	61
Tabela 12. Reatores biológicos com Etil-Benzeno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A_1 = velocidade de remoção do composto.	64
Tabela 13. Reatores biológicos com Xileno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A_1 = velocidade de remoção do composto.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

PSD – *Pseudomonas aeruginosa*.

PSD-50 – Reator biológico com *pseudomonas aeruginosa* na concentração de 50 mg/l de btex.

PSD-100 - Reator biológico com *pseudomonas aeruginosa* na concentração de 100 mg/l de btex.

PSD-150 - Reator biológico com *pseudomonas aeruginosa* na concentração de 150 mg/l de btex.

PSDM – Reator biológico controle com *pseudomonas aeruginosa* e meio de cultura.

EC – *Escherichia coli*.

EC-50 - Reator biológico com *escherichia coli* na concentração de 50 mg/l de btex.

EC-100 - Reator biológico com *escherichia coli* na concentração de 100 mg/l de btex.

EC-150 - Reator biológico com *escherichia coli* na concentração de 150 mg/l de btex.

ECM - Reator biológico controle com *escherichia coli* e meio de cultura.

ENT – *Enterobacter ludwigii*.

ENT-50 - Reator biológico com *enterobacter ludwigii* na concentração de 50 mg/l de btex.

ENT-100 - Reator biológico com *enterobacter ludwigii* na concentração de 100 mg/l de btex.

ENT-150 - Reator biológico com *enterobacter ludwigii* na concentração de 150 mg/l de btex.

ENTM - Reator biológico controle com *enterobacter ludwigii* e meio de cultura.

ECT - *Escherichia coli* transformada com os plasmídeos.

ECT-50 - Reator biológico com *escherichia coli* transformada na concentração de 50 mg/l de btex.

ECT-100 - Reator biológico com *escherichia coli* transformada na concentração de 50 mg/l de btex.

ECT-150 - Reator biológico com *escherichia coli* transformada na concentração de 50 mg/l de btex.

ECTM - Reator biológico controle com *escherichia coli* transformada e meio de cultura.

CTR – Reator biológico apenas com meio de cultura, sem inóculo.

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência.

GC – Cromatografia gasosa.

SUMÁRIO

1	Introdução	13
2	Objetivos	16
2.1	Objetivo Geral.....	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	Revisão Bibliográfica.....	17
3.1	Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno e Xileno (BTEX)	17
3.2	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	19
3.3	<i>Escherichia coli</i> como micro-organismos alvo na engenharia genética	20
3.4	<i>Enterobacter Ludwigii</i>	22
3.5	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	23
4	Material e Métodos	25
4.1	Microrganismos Utilizados.....	25
4.2	Escolha dos Genes e Design dos plasmídeos	25
4.3	Cultivo microbiano.....	26
4.4	Transformação dos plasmídeos.....	28
4.5	Testes de biodegradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos e crescimento em reatores biológicos.	29
4.6	Método analítico para mensuração dos BTEX.....	33
5	Resultados e Discussão	35
5.1	Escolha dos genes, montagem dos plasmídeos e transformação de <i>Escherichia coli</i>	35
5.2	Adaptações para metodologia analítica de BTEX no HPLC.....	40
5.3	Curva de calibração dos compostos alvos em HPLC	43
5.4	Taxa de crescimento microbiano	46
5.5	Degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos	55
5.5.1	Benzeno nas concentrações de 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L.....	55
5.5.2	Tolueno nas concentrações de 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L.....	59
5.5.3	Etil-Benzeno nas concentrações de 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L	62
5.5.4	Xileno nas concentrações de 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L.....	65
6	Conclusões	69
7	Referências.....	71

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o setor petroquímico constitui uma das principais fontes energéticas mundiais, sendo responsável pela geração de 40% de toda energia mundial. Com a exploração e a comercialização do petróleo e de seus derivados, vazamentos indevidos e acidentais vêm ocorrendo gerando graves danos ao meio ambiente, o que torna o desenvolvimento de tecnologia mais eficientes para o tratamento e monitoramento de ambientes contaminados por estes compostos que afetam adversamente a saúde humana e o ecossistema.

O petróleo bruto é uma mistura complexa de quatro principais famílias de compostos: (1) hidrocarbonetos saturados, incluindo os *n*-alcanos e isoalcanos (parafinas) e ciclanos (naftênicos ou cicloparafinas); (2) hidrocarbonetos aromáticos, dentre os quais destacam-se os BTEX (Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno e Xileno) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA); (3) resinas, compostos de caráter aromático muito polares, com massas moleculares de 500 a 1.000 g/mol; e (4) asfaltenos, de massa molecular entre 1.000 a 100.000 g/mol, compostos por misturas complexas de anéis poliaromáticos condensados, anéis naftênicos, heteroátomos e metais (Peters *et al.*, 2005).

Quando ocorre o derramamento de óleo bruto ou resíduos petroquímicos no meio ambiente, os processos físico-químicos (evaporação, oxidação fotoquímica, emulsificação e dissolução) começam a alterar a composição destes compostos. As frações de baixo peso molecular evaporam, hidrocarbonetos (principalmente os contendo anéis benzênicos - aromáticos) sofrem foto-oxidação, constituintes solúveis dissolvem na água do mar e os imiscíveis formam emulsões (Babaev *et al.*, 2019).

Devido às características físico-químicas dos hidrocarbonetos aromáticos, podem ser considerados substâncias poluentes prioritárias pelos órgãos de controle ambiental, pois alguns desses compostos são cancerígenos e perigosos para a saúde humana e o meio ambiente (Mulabagal *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2014). Por serem resistentes a degradação química, física e biológica e apresentarem potencial de bioacumulação e biomagnificação nas cadeias tróficas os hidrocarbonetos aromáticos fazem parte dos compostos poluentes orgânicos persistentes (POP) e representam risco à saúde humana e ao meio ambiente.

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza microrganismos para minimizar ou remover poluentes ambientais (Atlas, 1995). Esta técnica é uma metodologia eficiente para a recuperação de áreas poluídas, que influencia minimamente no equilíbrio ecológico, uma vez que não são adicionados suplementos químicos e intervenções físicas no meio já impactado, assim não alterando a estrutura físico-química do ambiente.

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são micro-organismos utilizados nos processos de biorremediação, pois possuem a capacidade de degradar ou assimilar substâncias orgânicas,

comumente encontradas no meio ambiente bem como capazes também de utilizar como fonte de carbono e energia compostos descartados de forma irregular no meio ambiente (Mahjoubi *et al.*, 2018).

Contudo para fazer o uso dos microrganismos na biorremediação, é preciso conhecer vários aspectos a seu respeito, como fisiologia e características genéticas, bem como qual transformações químicas são feitas ao degradar o poluente e principalmente quais os produtos e subprodutos (metabólitos) que essa degradação libera no meio (Iranzo *et al.*, 2001; John, Jisha, 2015).

Esta degradação pode ser realizada pela própria assimilação dos compostos como fonte de carbono (nutricional), produzindo enzimas extracelulares que auxiliam na decomposição das substâncias ou na assimilação como fonte de energia. Logo, se apresentam como poderosa alternativa aos métodos convencionais de remediação, sendo cada vez mais empregados na resolução de problemas ambientais causados por despejo irregular de compostos tóxicos e xenobióticos (Aislábie *et al.*, 2006).

Segundo Atlas (1995) mais de 70 gêneros microbianos, são capazes de utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, em áreas de recuperação ambiental. Algumas pesquisas têm sido desenvolvidas, objetivando estimular a atividade da microbiota local, que utiliza o hidrocarboneto como fonte de carbono, ou introduzir linhagens potencialmente ativas de microrganismos que degradam hidrocarbonetos no local atingido (Yuniati, 2018).

A mineralização dos hidrocarbonetos provenientes de óleo bruto depende das populações microbianas presentes no local, das condições físicas e químicas dos ambientes onde ocorreu o derramamento destes compostos no ambiente. Os microrganismos autóctones podem atuar de forma sinérgica entre diferentes espécies ou por meio de co-metabolismo auxiliando umas às outras para a degradação dos compostos xenobióticos do meio (Varjani *et al.*, 2015). Entretanto os poluentes despejados podem causar o estresse oxidativo de espécies derivadas de oxigênio como o íon superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e íon hidroxila (OH^-). Estes reativos de oxigênio podem danificar macromoléculas celulares levando a oxidação de proteínas, peroxidação de lipídeos e danos ao DNA, diminuindo ou inibindo a ação de micro-organismos autóctones (Wysocki, Tamás, 2010).

Entretanto por serem compostos tóxicos, é preciso saber como os microrganismos autóctones suportam elevadas concentrações destes compostos aromáticos, pois pode haver grande variação da concentração dos hidrocarbonetos presentes no local, tornando mais difícil a viabilidade celular no começo do processo de degradação destes compostos e conseqüentemente a sua eficácia de degradação (Song *et al.*, 1990; Ramos *et al.*, 1991; Lal B, 1996).

Uma alternativa para prolongar a viabilidade celular durante o começo da degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, seria a utilização de consórcios bacterianos, principalmente com

espécies nativas adaptadas a este meio, isso permite que várias espécies consigam degradar diferentes compostos ou até diferentes partes do mesmo composto tornando assim mais fácil o acesso ao carbono. (Dibble, Bartha, 1979; Eriksson, Dalhammar, 1995).

Segundo Carroll, (1993), Aruffo, (1987) e Silverman, (1989), a técnica de DNA recombinante, tem o objetivo de identificar, isolar, manipular e permitir a expressão genes em um hospedeiro. Esta técnica possui objetivos que podem ser divididos em cinco objetivos ou etapas principais, identificar novos genes capazes de produzir proteínas ainda não isoladas, compreender como funciona a regulação destes genes para expressar enzimas de interesse, conseguir realizar a manipulação destes genes, expressar genes que conferem resistência à diversas doenças e produzir grande quantidade das enzimas de interesse, principalmente as que possuem alta demanda.

A espécie bacteriana *Escherichia coli* é comumente utilizada como hospedeira, na realização da técnica do DNA recombinante, por ter sido a primeira bactéria a ter seu genoma completamente estudado, pela maior facilidade de realizar as transformações com os plasmídeos geneticamente modificados, pelo seu crescimento rápido e por conseguir expressar grande quantidade de proteínas (Yu, Banting, Neumann, 2021).

O desenho de plasmídeos específicos para genes relacionados a degradação de hidrocarbonetos aromáticos e sua inserção em bactérias pode ser uma alternativa para amenizar o estresse ambiental causado por estes poluentes. Inúmeros estudos citam que as técnicas convencionais de mitigação de impactos ambientais, sejam de natureza física, química ou físico-química, devem ser completadas com a biorremediação, multiplicando-se a capacidade de depuração do ambiente, além de permitir o restabelecimento do ecossistema local

Dessa forma, o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados por meio da técnica de DNA recombinante pode ser uma alternativa para o processo de biorremediação de hidrocarbonetos aromáticos provenientes de sítios contaminados com óleo bruto (BTEX e HPA) facilitando assim a recuperação ambiental e ciclagem dos nutrientes das áreas impactadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver cepas de *Escherichia coli* geneticamente modificadas por meio da técnica de DNA recombinante capaz de degradar ou auxiliar na degradação de hidrocarbonetos aromáticos derivados de compostos petroquímicos (BTEX).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (i) Seleção do(s) gene(s) envolvido(s) nos processos de degradação dos hidrocarbonetos monoaromáticos;
- (ii) Adaptação de metodologia em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para mensuração dos BTEX;
- (iii) Construção de bactérias recombinantes com capacidade de degradar BTEX;
- (iv) Comparar a eficiência e velocidade de degradação das bactérias recombinantes com os microrganismos isolados de substrato contaminado.
- (v) Realizar análises comparativas de crescimento em diferentes concentrações de BTEX.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BENZENO, TOLUENO, ETIL-BENZENO E XILENO (BTEX)

Os compostos benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno, chamados comumente de BTEXs, são hidrocarbonetos monoaromáticos e fazem parte do grupo dos ácidos orgânicos voláteis, são perigosos e altamente cancerígeno, as principais fontes de BTEX, isto é, onde há a produção destes compostos aromáticos orgânicos, normalmente advém da indústria petroquímica, queima inacabada de matéria orgânica, também podem ser emitidos através da queima de combustíveis e também de causas naturais, como metabólitos alguns organismos (Shen *et al.*, 2018; Bahrami M., Pirmohammadi, Bahrami A., 2021).

Devido a suas características físico-químicas, alguns acidentes de derramamento de combustíveis, contaminam o solo e o lençol freático com os BTEX, mas essa contaminação pode se afastar muito da sua fonte de origem, isto é, onde ela de fato ocorreu, principalmente devido a alta solubilidade destes compostos em água, eles podem migrar por sistemas hídricos e contaminar inclusive a água potável utilizada para consumo humano (Dou *et al.*, 2008).

Isso se dá pois os BTEX possuem em sua estrutura química um anel poli-aromático, tornando-os altamente solúveis em água **Tabela 1**, são considerados também poluentes prioritários devido aos danos que podem causar à saúde mesmo em baixíssimas concentrações, como câncer e mudanças hematológicas (Anderson, 2000; Fayemiwo, Daramola, Moothi, 2017; Xu, Mulchandani, Chen, 2003).

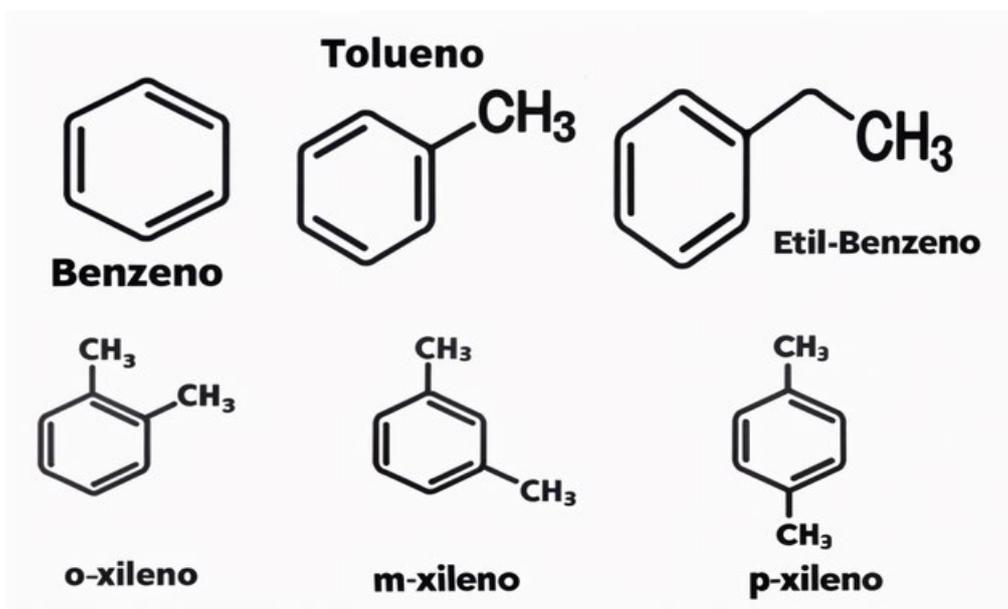
Tabela 1. Parâmetros dos BTEXs.

Parâmetros	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	Xileno
Formula química	C_6H_6	$C_6H_5CH_3$	$C_6H_5CH_2CH_3$	$C_6H_4(CH_3)_2$
Peso molar	78,12	92,15	106,18	106,18
Densidade (g/mL)	0.8765	0.8669	0.8670	0.8685
Solubilidade (mg/L)	1780	500	150	150
Ponto de ebulição	80.1°C	110.6°C	136°C	138.3°C - 144.4°C

Fonte: Adaptada de Fayemiwo *et al.* (2017).

Também são considerados compostos não reativos, por possuírem estrutura fechada (Bunnett, Zahler, 1953), como podemos observar na **Figura 1**.

Figura 1. Estrutura físico-química dos BTEX.



Fonte: Adaptado de Fayemiwo, Daramola, Moothi (2017).

Por serem compostos voláteis, isto é, seu estado físico de líquido para gasoso em pressão e temperatura ambiente, sendo assim sua principal rota de contaminação em organismos é através da inalação pelo sistema respiratório (Salminen *et al.*, 2004; Heibati *et al.*, 2017), a exposição prolongada pode causar sérios danos ao organismo, principalmente no sistema respiratório, podendo causar também danos ao sistema neurológico (Rumchev *et al.*, 2007), os principais sintomas da intoxicação por esses compostos são: dor de cabeça, tontura, náuseas e vômito (Mohammadyan *et al.*, 2016).

A resolução do CONAMA N° 430/2011, indica que o valor máximo permitido de concentração de BTEX para efluentes industriais é de: Benzeno 1,2 mg/L, Tolueno 1,2 mg/L, Xileno 1,6 mg/L e Etilbenzeno 0,8 mg/L, além disso a resolução N° 273/2000, também obriga que postos de combustíveis realizem análises de BTEX, para verificar se houver alguma contaminação no solo ou no lençol freático.

Apesar destes fatores, os BTEX são uns dos compostos químicos mais abundantes no mundo e utilizados em muitas indústrias, principalmente como solvente para inseticidas e tintas por exemplo (Fayemiwo *et al.*, 2017), que provavelmente irão gerar mais contaminações dos ecossistemas.

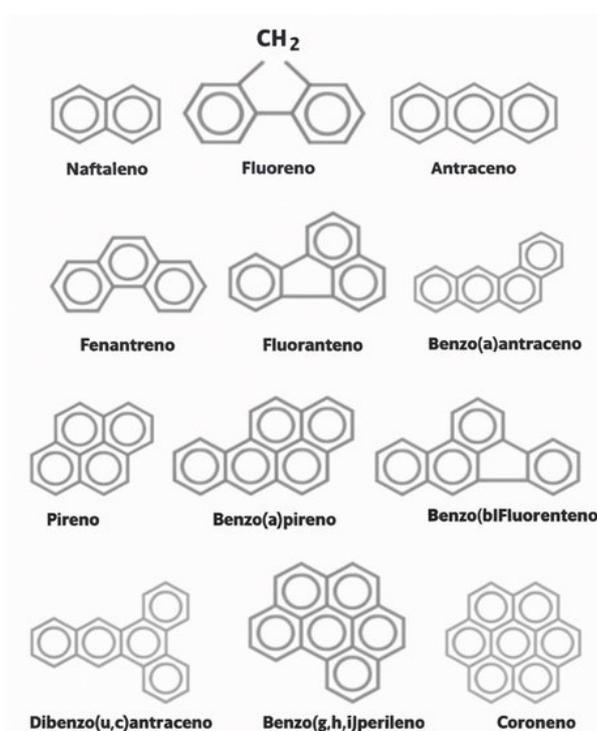
3.2 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), podem ser gerados por meio da pirólise, isto é, da queima não acabada de matéria orgânica ou derivado de óleo bruto como o petróleo. Por serem considerados compostos tóxicos, os HPA vem sendo estudados quanto a sua carcinogenicidade principalmente após o seu primeiro isolamento em laboratório que foi o benzo-alfa-pireno (Bap) a partir da fuligem de chaminés. (Freeman, Cattell, 1990).

Por definição são compostos que possuem dois ou mais anéis de benzeno fusionados em sua estrutura química, se tornando mais estável e recalcitrante (Lawal, 2017; Blumer *et al.* 1997), sua toxicidade está diretamente relacionado a quantidade de anéis aromáticos encontrados em sua estrutura, sendo os compostos com quatro ou menos anéis considerados leves e acima disso considerados pesados, e sua relação com a toxicidade é positiva, isto é, quanto maior a quantidade de anéis maior seu peso molecular e conseqüentemente maior sua toxicidade. (Kuppusamy *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Lawal, 2017).

Segundo Cerniglia, (1992) apesar de serem compostos formados desde anéis simples à mais complexos, eles possuem alta complexidade referente a diversidade na disposição dos anéis aromáticos, alterando completamente todas as suas características de físicas à toxicológicas, como podemos observar na **Figura 2**.

Figura 2. Estrutura química e física de alguns dos HPA mais estudados.



Fonte: Adaptado de Haritash, Kaushik, (2009) e Lawal, (2017).

Estes compostos podem ser encontrados em grande variedade de ambientes como no ar, na água, solo e sedimento, isto está diretamente relacionado com seu peso molecular. Os HPA contidos no ar geralmente são mais leves, isto é, possuem até quatro anéis aromáticos, eles estão no estado de vapor ou aderidos a pequenas partículas em suspensão no ar, tudo isso relacionado tanto a fatores estruturais da molécula, ambientais e atmosféricos (Sokhi *et al.*, 2008).

Já os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos encontrados na água podem ser considerados poluentes ambientais mais gerados pela ação humana, foram primeiramente isolados e identificados de águas nas regiões costeiras e de peixes encontrados em estuários na América do Sul (Lawal, 2017), em estudos realizados por Zhi *et al.*, (2015) foi verificada a relação do peso molecular relacionado a coluna de água em lago, neste ele localizou alta taxa de HPA de baixo peso molecular, com isso ele percebeu que naquela região ao redor do lago, as principais fontes de poluição por estes compostos estavam relacionados ao petróleo como a queima de combustíveis fósseis e outras fontes orgânicas.

Segundo Lawal, (2017) os HPA presentes do solo ou em sedimentos estão fortemente relacionados a processos industriais ou até referentes e poluentes domésticos, o mesmo diz que os resíduos não tratados ou fracamente tratados, em dado momento entrará em contato com algum corpo d'água, fazendo assim com que esses poluentes fiquem dissolvidos ou suspensos na água e até em leitos onde temos sedimentos de solo, podendo também sofrer volatilização, estando assim diretamente relacionado a poluição atmosférica. Estes pontos refletem a importância ambiental e biorremediação destes compostos em ambientes naturais.

3.3 *ESCHERICHIA COLI* COMO MICRO-ORGANISMOS ALVO NA ENGENHARIA GENÉTICA

Escherichia coli é uma espécie da bactéria que foi descoberta por Theodor Escherich, (1884), ela se encontra normalmente no trato gastrointestinal de animais de sangue quente e foi isolada a partir das fezes de bebês ainda em fase neonatal e em crianças jovens. Primeiramente foi dado o nome de *Bacillus coli* em 1895, após anos de sua descoberta e revisão de nomenclatura, lhe foi dada a identificação de *Escherichia coli* (Escherichia, 1998; Henry, 2015; Yu *et al.*, 2021).

Desde a sua descoberta, foram realizados muitos estudos acadêmicos a respeito de todos os seus aspectos como patogenicidade, ecologia, genética e com tantos estudos foi considerada bactéria modelo no estudo da microbiologia (Yu *et al.*, 2021).

É uma bactéria naturalmente não esporulante, anaeróbia facultativa e gram-negativa, ou seja, possui a parede celular com bicamada glicoproteína e uma camada fina de peptídeoglicano, ficando coradas em vermelho após a técnica da coloração de gram, podem ser encontradas também no trato gastrointestinal de diversos grupos animais. (Gordon, Cowling, 2003).

A *Escherichia coli* é capaz de formar biofilme, e os membros deste grupo podem apresentar flagelo para facilitar a locomoção, fímbrias para se aderir ao substrato formando assim biofilme, para isso se faz necessário fonte de carbono facilmente assimilável, conseguindo assim formar colônias no trato gastrointestinal (Sicard *et al.*, 2017).

Apesar disso elas podem ocupar imensa variedade de ecossistemas e nichos, podem inclusive ser encontradas fora do ambiente interno do hospedeiro, e estima-se ainda que cerca de metade da população total da espécie está adaptada a sobreviver em ambientes externos (Tenailon *et al.*, 2010), inclusive em solos de clima subtropical (Ishii *et al.*, 2006, 2010; Byappanahalli *et al.*, 2012).

Esse tipo de solo normalmente é encontrado em altitudes mais elevadas, com grande precipitação e baixas temperaturas, isso pode propiciar aumento na matéria orgânica (Streck *et al.*, 2002), aumentando assim consequentemente as fontes de carbono que podem ser utilizadas por estas bactérias, elas também podem ser encontradas na superfície da água ou de outros tipos de sedimentos (Jang *et al.*, 2015), como águas com alto teor de salinidade, ambientes estuarinos (Berthe *et al.*, 2013) e recentes estudos realizados por Blyton, Gordon, (2017) mostram que também é possível encontrar *Escherichia coli* em água mineral tratada utilizada para consumo humano, isto mostra que esta espécie possui grande capacidade adaptativa, podendo tolerar diversos tipos de ambientes, inclusive ambientes com condições mais extremas como alta salinidade e variação de pH.

Em condições ótimas de crescimento, isto é, fonte de macro e micronutrientes, pH, disponibilidade de oxigênio e falta de competição, a *Escherichia coli* pode se replicar rapidamente, em alguns casos a replicação de uma célula em duas pode levar apenas 20 minutos (Jang *et al.*, 2017). Porém em condições naturais, vários fatores tanto bióticos quanto abióticos interferem em sua capacidade de crescimento e sobrevivência (Newall *et al.*, 2015). Estes fatores podem influenciar de maneira positiva ou negativa na velocidade de crescimento, sobrevivência e viabilidade celular, nos fatores abióticos podemos listar a temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, disponibilidade de água e condições ambientais como iluminação e radiação solar. Já os fatores bióticos estão intimamente relacionados com a competição por nutrientes, ou seja, presença de outros micro-organismos (Jang *et al.*, 2017).

Por já possuir seu genoma completamente conhecido, muitos testes filogenéticos foram realizados, e mostrou que genes adquiridos de forma horizontal, por processos de transdução, transformação e conjugação, ocupam grande parte da informação genética da cepa comercial *E. coli* K-12 MG1655, aproximadamente 24.5% dos genes encontrados foram originados a partir de transferência horizontal (Lawrence, Ochman, 2002).

Com o avanço dos estudos acadêmicos, diversas manipulações genéticas foram realizadas em *E. coli*, principalmente para produção de enzimas para solucionar diversos problemas e para fabricação de outros produtos industriais (Jang *et al.*, 2017).

Alguns usos de engenharia genética foram realizados por Jacoby *et al.*, (1978), utilizando *Escherichia coli* para transposição e expressão de genes de *Pseudomonas putida* relacionados a degradação de Tolueno, Zylstra, Wackett, Gibson, (1989), realizaram estudo semelhante afim de clonar gene para expressão de tolueno dioxygenase para degradação de tricloroetileno, um solvente industrial.

Além de auxiliar em processos de biorremediação, a engenharia genética em *Escherichia coli* tem potencial para uso na área de saúde, principalmente na produção de fármacos, como a insulina que tem a função de controlar os níveis de glicemia sanguínea, sendo necessário seu uso exógeno principalmente em pacientes diabéticos, Govender *et al.*, (2020) clonou o gene humano de insulina e inseriu em *E. coli* através do vetor pET21b e conseguiu expressar em escala laboratorial, sendo esta 100% similar a insulina humana.

Essa tecnologia pode ser utilizada também para detecção de diversos compostos como descrito por Xu, Mulchandani, Chen, (2003), na qual o gene codificador da enzima tolueno dioxygenase-peroxidase, foi clonado no vetor pXTD13, inserido em *E. coli* através de transformação, tornando-a capaz de detectar BTEX em 3 horas, sem necessidade de realizar a lise celular.

Estudo parecido foi realizado por Li *et al.*, (2008), que através da técnica do DNA recombinante, clonou genes de luminescência e fluorescência no vetor pPROBE-NT e realizou a transformação em cepa de *E. coli* DH5 α , tornando essa espécie capaz de emitir luz na presença de tolueno, servindo assim de bioindicador do composto alvo.

3.4 ENTEROBACTER LUDWIGII

O gênero *Enterobacter* foi descrito pela primeira vez por Hormaeche e Edwards, (1960), são bactérias comumente gram-negativas, anaeróbias facultativos, fermentativas, geralmente em formato de bastonetes e não possuem pigmentos, seu maior crescimento normalmente é entre 18 e 24 horas e suportam temperaturas de 15°C a 42°C, sendo sua temperatura ótima de crescimento em cerca de 36°C, apesar de serem consideradas patógenas ou comensais, geralmente não apresentarem riscos significativos a saúde humana, elas tem a capacidade de expressar a enzima beta-lactamase conferindo a ela, resistência a ampicilina, amoxicilina e cefoxitina (Hoffman *et al.*, 2004; Paauw *et al.*, 2008).

A espécie *Enterobacter ludwigii* pode apresentar naturalmente resistência a antibióticos (Davin-Regli, Lavigne, Pagês, 2019), estudos também evidenciam que *E. ludwigii* é causadora de infecções nosocomiais, principalmente em recém-nascidos (Flores-Carrero *et al.*, 2016)

Apesar de ter sido isolada de amostras clínicas, *E. ludwigii* pode ser encontrada no solo, nas rizosferas das plantas, servindo tanto como controle de outros microrganismos patogênicos para as plantas, como também auxiliando no crescimento através da ciclagem dos nutrientes, em ambientes aquáticos e no interior de animais, podem ser agente causador de patogenicidade, algumas espécies do gênero *Enterobacter* podem apresentar resistência à outras drogas. (Shoebitz *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2018).

Estudos realizados por (Yousaf *et al.*, 2011), mostram que além disso essa espécie possui a capacidade de degradar hidrocarbonetos de maneira eficiente principalmente no solo, conseguem ocupar o interior de plantas e auxiliar na degradação destes compostos contaminantes que provavelmente iriam causar intoxicação nas plantas, vale ressaltar que a eficiência de degradação dos compostos foi maior quando estavam associados com as plantas.

3.5 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram negativa, possui forma de bastonetes, e pode apresentar flagelo. Seu crescimento ocorre entre 25°C e 37°C de temperatura, mas também podem suportar temperaturas de até 42°C, conseguem sobreviver em grande variedade de ambientes, podendo ser agentes patogênicos em plantas, animais e também em humanos, podendo causar sérias infecções, principalmente em pacientes com deficiência imunológica (Wu *et al.*, 2015).

Muitas cepas são capazes de produzir pigmentos de várias cores, como a pyocyanina que confere cor verde azulada, pyoverdina de cor verde amarelada e fluorescente e pyoburina com cor vermelho amarronzado, esses pigmentos possuem diversas funções, entre elas conferir resistência à *Pseudomonas aeruginosa* nos pulmões de alguns pacientes por exemplo, interferindo assim em diversas funções do hospedeiro como a função de respiração celular, crescimento celular entre outros (Caldwell *et al.*, 2009).

Em 2017 foram reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde como patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos, pois elas apresentam resistência a antibióticos, sendo natural ou adquiridas (Livermore, 2002), isso se deve principalmente a transferência de material genético interespecies entre bacilos gram-negativos através dos plasmídeos (Lincopan, 2008), também são capazes de formar biofilme (Ghafoor, 2011).

P. aeruginosa possui capacidade de crescer em substrato contaminado por compostos derivados do petróleo como o diesel, tanto em meio solo quanto em meio líquido, além disso consegue degradar uma ampla gama de hidrocarbonetos aromáticos como os *Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos* (HPA) e Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno e Xileno (BTEX) (Gheorge *et al.*, 2011; Mohammad-Saeed *et al.*, 2017).

É conhecida também por degradar diferentes concentrações de BTEX em conjunto com Éter metil-terc-butílico (MTBE) como mostra estudos realizados por Lin, Cheng, Tsai, (2007), o MTBE é um aditivo utilizado para aumentar a eficiência de combustão da gasolina, contudo acidentes já foram relatados com composto, causando grande impacto ambiental, principalmente devido a sua toxicidade e alta solubilidade em água, além de serem considerados compostos recalcitrantes quanto a biodegradação

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS

As cepas de bacterianas utilizadas neste estudo são *Escherichia coli* DH5 α e *Pseudomonas aeruginosa*, foram cedidas da Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos (UFPEDA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Foi utilizada também a *Enterobater Ludwigii* isolada de três lagoas da Estação de tratamento de esgoto (ETE) Multifábrica, localizada na cidade de Jaboatão dos Guararapes/PE, uma vez que possuem capacidade de crescer em meio contendo hidrocarbonetos poliaromáticos e derivados de petróleo lançados nesta ETE como resíduos líquidos industriais e que poderia ter elevado potencial de degradar ou auxiliar na degradação destes compostos (Moterran *et al.*, 2024).

4.2 ESCOLHA DOS GENES E DESIGN DOS PLASMÍDEOS

Dois plasmídeos foram desenhados e confeccionados pela empresa especializada GOGNONE, localizada no Rio de Janeiro, o vetor escolhido foi pET28a por possuir o operon *lac*, facilitando assim o controle na expressão dos genes de interesse, ambos os plasmídeos nomeados como pET28A_todC2 e pET28A_dmpB foram construídos com os genes de interesse, sendo eles respectivamente:

todC2	“CAT	ATGAAACTGC	TGAACGACCG	CCGCTTTGAA	GAATGGTTTG
CGCTGCTGGC	TGAGGACATT	CACTACTTCA	TGCCAATCCG	CACTACTCGC	
ATCATGCGTG	ACAGCCGTCT	GGAGTATTCT	GGTTCTCGCG	AGTACGCTCA	
TTTTGACGAT	GATGCTACGA	TGATGAAAGG	CCGCCTGCGC	AAAATCACCT	
CCGACGTATC	CTGGTCCGAA	AATCCAGCCT	CTCGTACCCG	TCACCTGGTC	
TCTAACGTGA	TGATCGTTGG	TGCGGAAGCG	GAAGGCGAAT	ACGAAATCAG	
CTCTGCATTC	ATCGTATAACC	GTAACCGTCT	GGAACGTCAG	CTGGACATTT	
TTGCGGGCGA	ACGTCGTGAT	ACCCTGCGTC	GTAATACCTC	TGAGGCGGGT	
TTCGAAATCG	TCAACCGTAC	CATCCTGATT	GACCAGTCTA	CCATCCTGGC	
GAACAACCTG	TCCTTCTTCT	TCTAACTCGAG”	dmpB	“CAT	ATGAAAAAAG
GCGTTATGCG	TCCTGGCCAT	GTTCAACTGC	GCGTTCTGAA	CCTGGAATCT	
GCTCTGGCTC	ACTATCGTGA	CCTGCTGGGT	CTGATCGAGA	TGGACCGTGA	
CGAACAAGGC	CGTGTATAACC	TGAAAGCGTG	GACCGAGGTG	GATAAATTCT	
CCGTTGTACT	GCGTGAAGCG	GACCAACCGG	GTATGGACTT	CATGGGTTTC	
AAGGTCATCG	ACGAAGATTG	CCTGAACCGC	CTGACCCAGG	ATCTGCTGAA	

CTATGGTTGC	CTGATCGAAA	CCATTCCGGC	AGGCGAGCTG	AAAGGTTGTG
GTCGTCGTGT	ACGCTTCCAG	ACTCCATCTG	GCCATTTCTT	CGAGCTGTAC
GCCGATAAAG	AATATACCGG	CAAATGGGGC	CTGGAAGAAA	TCAACCCGGA
AGCATGGCCG	CGTAATCTGA	AAGGTATGCG	TGCCGTACGT	TTCGATCATT
GTCTGCTGTA	TGGTGACGAA	CTGCAGGCGA	CGTACGCACT	GTTTACTGAA
GTGCTGGGTT	TCTACCTGGC	AGAACAAGTG	ATTGACGACG	ATGGTACTCG
CGTTGCACAG	TTCCTGTCCC	TGTCCACCAA	AGCCCATGAT	GTTGCGTTCA
TTCACTGCCC	GGAAAAGGGT	AAATTCCACC	ATGTTTCCTT	CTTCCTGGAA
ACCTGGGAGG	ACGTCCTGCG	TGCCGCCGAT	CTGATCAGCA	TGACTGACAC
CTCCATCGAT	ATCGGCCCAA	CTCGTCACGG	TCTGACTCAC	GGCAAAACCA
TTTACTTCTT	CGACCCTTCT	GGCAACCGTA	ACGAGGTATT	CTGTGGTGGT
GACTATAACT	ATCAGGATCA	CAAACCGGTA	ACGTGGCTGG	CTAAAGATCT
GGGCAAGGCA	ATCTTCTACC	ATGATCGTGT	CCTGAACGAG	CGTTTCCTGA
CCGTGCTGAC	CTAACTCGAG			

A inserção dos mesmos foi realizada no sítio entre NdeI CATATG e XhoI CTCGAG do vetor pET28a utilizando software SnapGene, os genes foram inseridos nestes sítios por já possuírem elevado sucesso na expressão de diversas proteínas na literatura (Takai, Hisamatsu, 2016). Os dois plasmídeos também possuem o gene kanR que confere resistência ao antibiótico Canamicina, necessária para seleção das cepas que foram capazes de internalizar os plasmídeos, ou seja, o processo de transformação, a Canamicina foi selecionada por ser um antibiótico de amplo espectro por possuir efeito inibitório no crescimento de cepas de *Escherichia coli* (Baccaro *et al.* 2002; Aviles *et al.*, 2021).

4.3 CULTIVO MICROBIANO

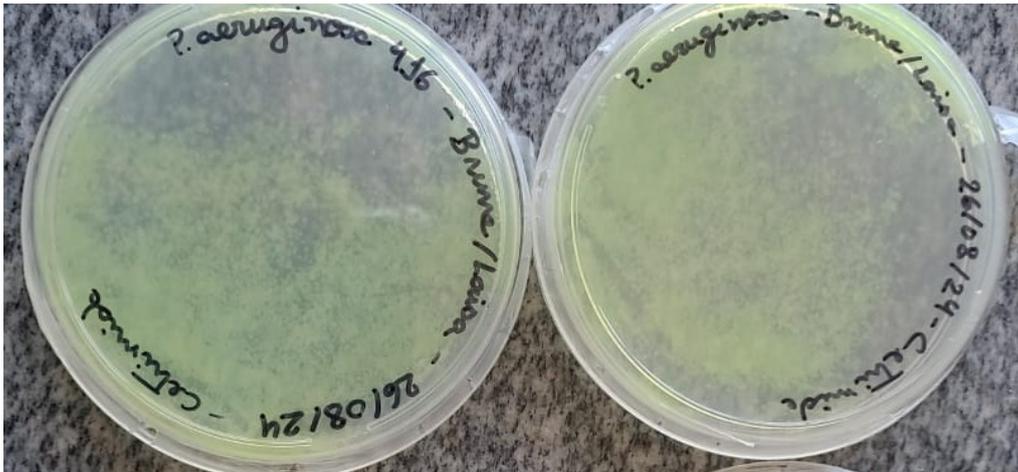
O cultivo dos microrganismos para inocular nos biorreatores foi realizado em frascos de vidro com volume total de 100 mL contendo 80 mL de volume reacional com os meios de cultura utilizados esterilizados e 20mL de headspace. Os frascos e meios de cultura foram esterilizados por 15 minutos em autoclave à 121°C. para o crescimento de *Escherichia coli* e *Pseudomonas Aeruginosa*, foi utilizado o meio *Brain Heart Infusion* (BHI) para promover o máximo de crescimento possível como mostra estudos de (Low *et al.*, 2013), *Enterobacter Ludwigii* foi colocado para crescer em meio mineral contendo: CaCl₂ (0,0074 g/L), MgSO₄·6H₂O (0,463 g/L), MnSO₄·H₂O (0,01 g/L), ZnSO₄·7H₂O (0,02 g/L), (NH₄)Fe(SO₄)₂·12H₂O (0,0197 g/L), KH₂PO₄ (0,5 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (0,5 g/L) e NaCl (9 g/L) e Peptona (2 g/L).

Para o cultivo de *Escherichia coli* transformada com os plasmídeos, foi utilizado o meio de cultura BHI adaptado com adição de canamicina (antibiótico) e lactose necessária para ativação do

promotor no operon *lac* e para expressão do gene de resistência, garantindo assim o crescimento apenas das colônias recombinantes.

Também foi realizado o crescimento microbiano em placa de Petri com meio de cultura Ágar BHI - *E. ludwigii*, *P. aeruginosa* e Ágar Cetrimida - *P. aeruginosa* Figuras 3, 4 e 5, as colônias foram coletadas, colocadas para crescimento em reatores com meio de cultura para posteriormente realizar a inoculação nos reatores com adição dos compostos alvos.

Figura 3. *Pseudomonas aeruginosa* em meio ágar cetrimida com cor verde fluorescente.



Fonte: O Autor (2024).

Figura 4. *Pseudomonas aeruginosa* em meio BHI com colônias de cor branca.



Fonte: O Autor (2024).

Figura 5. *Enterobacter ludwigii* em meio Ágar BHI com colônias de cor branca.



Fonte: O Autor (2024).

4.4 TRANSFORMAÇÃO DOS PLASMÍDEOS

Os plasmídeos foram preparados em *vial*, amostra única, contendo aproximadamente 5 μ g, com isso foi realizada a dissolução em 50 μ L de água deionizada autoclavada e filtrada em filtro de 0,22 μ m, resultando assim a concentração plasmidial de 100ng/ μ L.

Foi utilizado o meio de cultura Luria-Bertani (LB) o qual é um meio utilizado para manutenção e cultivo de cepas recombinantes de *Escherichia coli* em procedimentos de biologia molecular, contendo Triptona (10 mg/L), Extrato de Levedura (5 mg/L), Cloreto de Sódio (5 mg/L), o pH final deve ser ajustado a $7,0 \pm 0,2$ (Clark *et al.*, 2002).

Para transformações dos plasmídeos foi utilizada metodologia descrita segundo Hanahan *et al.*, (1983), na qual foi adicionado em *vial* 1 μ L da solução com os plasmídeos com 50 μ L de suspensão da cepa de *Escherichia coli* DH5 α , o mesmo foi levado para incubação em gelo a -20°C por 15 minutos, banho maria a 42°C por 1 minuto e novamente em gelo por mais 1 minuto, com esse choque térmico os poros da parede membrana celular se abrem permitindo a entrada dos plasmídeos.

No mesmo *vial* foi adicionado 800 μ L de meio LB líquido e levado para estufa com temperatura de 37°C por 30 minutos, após isso foi realizada a centrifugação em 1200rpm por 10 minutos, causando assim a precipitação das células para retirada do excesso de meio de cultura. Por fim, foi realizado o plaqueamento com 200 μ L da suspensão de célula utilizando alça de Drigalski em placas de petri contendo 20 mL de meio solido LB Ágar com 20 μ L de solução de canamicina na concentração de 50 μ L/ml e 40 μ L de iptg, sendo esse último substância análoga a lactose, permitindo

o início da transcrição através do promotor, as placas foram incubadas em estufa com temperatura de 37°C por 24 horas.

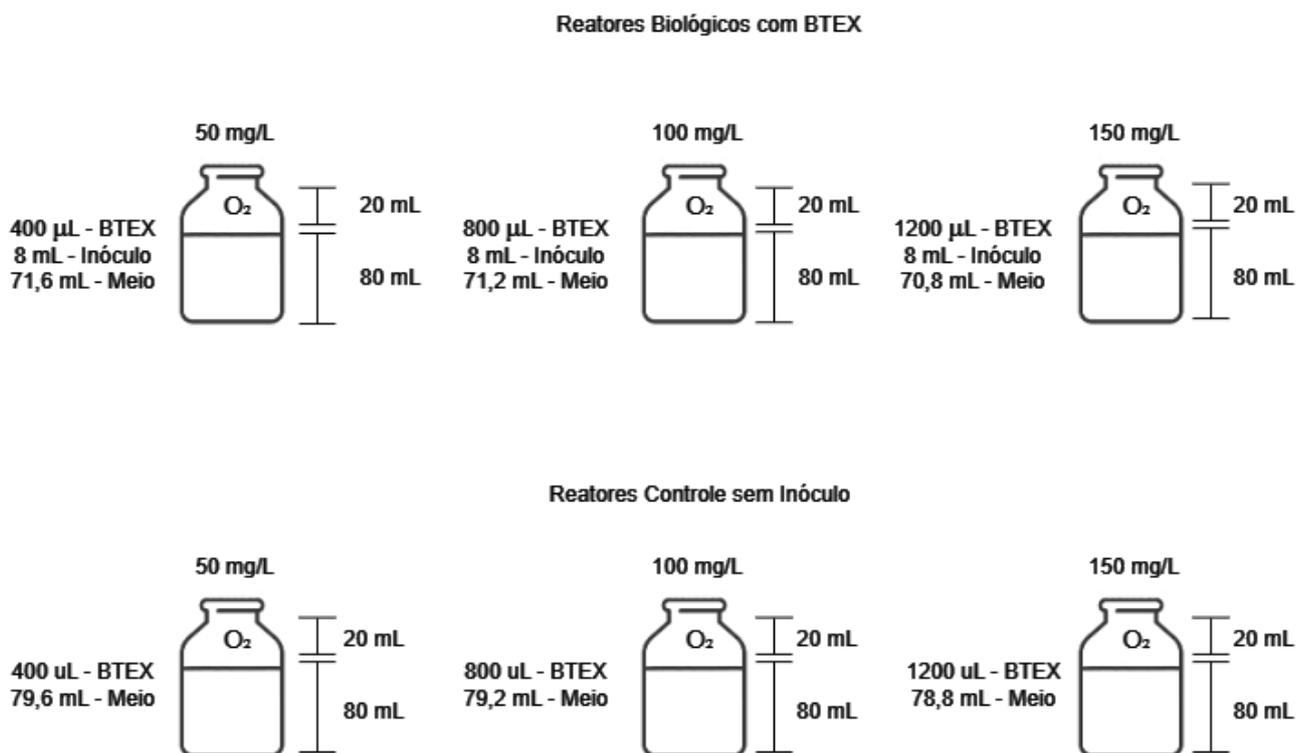
Após o crescimento das colônias, elas foram coletadas com ajuda de alça de platina e inoculada em biorreator contendo 80ml de meio de cultura BHI adaptado com adição de Lactose na concentração de 5g/L e de Canamicina na concentração de 5µL da solução estoque de 50µg/ml para cada 5ml de meio de cultura, totalizando assim 80µL, visando o crescimento do número de células recombinantes, bem como garantir a seleção para posterior inoculação nos biorreatores contendo BTEX.

4.5 TESTES DE BIODEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS E CRESCIMENTO EM REATORES BIOLÓGICOS.

Para os testes de biodegradação visando padronizar todas as culturas, mesmo algumas sendo descritas como anaeróbias facultativas e aumentar a eficiência da degradação, foram montados reatores aeróbios em frascos de vidro com 100ml de volume total em triplicata para cada uma das três diferentes concentrações teóricas de BTEX do estudo, sendo elas 50mg/L na qual foi utilizado 400 µL de solução estoque de BTEX com concentração de 10 g/L, 8 mL de inóculo e 71,6 mL de meio de cultura totalizando assim 80 mL. Para os reatores contendo 100mg/L de BTEX foi acrescentado 800 µL da solução estoque de BTEX, 8mL de inóculo e 71,2 mL de meio de cultura e por fim, para os reatores biológicos contendo 150mg/L de BTEX foi acrescentado 1200 µL da solução estoque, 8 mL de inóculo e 70,8 mL de meio.

Os controles para cada concentração de BTEX também foram montados em triplicadas, porém estes utilizando apenas meio de cultura e solução contendo os hidrocarbonetos aromáticos, sendo assim para 50 mg/L foi utilizado 400 µL de BTEX para 79,6 mL de meio, para os reatores contendo 100mg/L de BTEX foi adicionado 800 µL de BTEX para 79,2 ml de meio e para os reatores contendo 150mg/L foi adicionado 1200 µL de BTEX para 78,8 mL de meio, a única diferença foi para *Escherichia coli* transformada, na qual também foi adicionado 80 µL de 50 µL/mL da Canamicina e o meio de cultura foi suplementado com Lactose 5 g/L **Figura 6**.

Figura 6. Reatores biológicos, volume e concentração de solução.



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Os reatores biológicos foram mantidos em temperatura de 37°C, sob agitação constante à 150rpm, para permitir maior superfície de contato das células com os compostos, além de manter a oxigenação no meio líquido.

O crescimento dos microrganismos foi mensurado por meio de densidade óptica no comprimento de onda de 620nm (OD₆₀₀) utilizando espectrofotômetro de luz visível (UV-Vis), Prove 300 plus largura da banda espectral 4 nm Spectroquant®, marcaMerck.

Foi calculada a taxa máxima de crescimento (μ_{max}) em função do tempo, para entender o potencial de crescimento dos microrganismos nas condições em que foram submetidos durante o estudo, podendo ser utilizada como base comparativa entre as concentrações de BTEX nos reatores biológicos (Tang, Meadows, Keasling, 2006; Edwards *et al.*, 2012).

Para isso foram utilizadas duas equações, a Equação 1, modificada de Blanch and Clark, (1997):

$$\mu_{Abs} = \left(\frac{\Delta Abs}{\Delta t} \right) / AbsI \quad (\text{Equação 1})$$

Onde μ_{Abs} é a taxa de de crescimento específico máximo, ΔAbs é a variação da absorvância, Δt é a variação do tempo e AbsI é o valor de absorvância intermediário entre os valores de ΔAbs .

E a Equação 2, modificada de Smith, (2019):

$$y = \ln (x) \quad (\text{Equação 2})$$

Na qual y é o expoente ao qual a base μAbs precisa ser elevada para resultar em x , retornando o logaritmo natural de μAbs , com esses valores os dados foram tabulados obter a equação reduzida ($y = ax + b$) da reta, podendo traçar assim uma tangente ao ponto de inflexão da curva sigmoide, ajustada para mostrar em x logaritmo natural da concentração de células (absorbância) em função do tempo (Baranyi, Pin, 1999).

A degradação dos compostos alvos (BTEX) foi mensurada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), pelo cromatógrafo modelo e2695 marca *Waters*, utilizando metodologia descrita por Mudhaffer, Ali, Risalah, (2018) modificada.

A análise de degradação, eficiência de remoção e viabilidade das células recombinantes foram realizadas por meio de ajustes matemáticos como Gompertz modificado (Equação 3) (Motteran *et al.*, 2014; Zwietering *et al.*, 1990), e modelo de decaimento exponencial (Equação 4), ambos utilizando o software OriginPro (*OriginLab Corporation*).

$$H = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\left(\frac{Rm \cdot e}{P} \right) \cdot (\alpha - t) + 1 \right] \right\} \quad (\text{Equação 3})$$

Em que P é a produção potencial de subprodutos ($\mu\text{mol/L}$), Rm é a taxa de produção de subprodutos ($\mu\text{mol/L.h-1}$); t é o tempo (horas), e – Número de Euler (2.71828) e α é o tempo precedente a produção subprodutos (horas).

$$C = Cr + Ci - Cr \exp (-k^1_{app} \cdot t) \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo, C a Concentração do contaminante (mg/L); Cr = Concentração residual do contaminante (mg/L); Ci = Concentração inicial do contaminante (mg/L); k^1_{app} = constante cinética (hora^{-1}); t = tempo (horas)

Para a análise de BTEX foram retiradas diariamente alíquotas de 3,5 mL por reator com seringa e agulha esterilizada, no qual 1 mL foi utilizado para mensurar o crescimento bacteriano em cubeta de quartzo de 10mm com volume total de 1 mL por OD600 e 2 mL da alíquota foi filtrada em filtro de 0,22 μ m (PVDF celulose) **Figura 7** e adicionada em vial com volume de 2 mL para análise no HPLC. O volume de 2 mL da alíquota foi utilizado afim de diminuir o *headspace* do *vial* diminuindo a possibilidade de volatilização dos compostos alvos.

Figura 7. Filtro de seringa de 0,22 μ m de Celulose.



Fonte: O Autor (2024).

As análises em HPLC foram feitas em dois reatores por análise, isto é, uma amostra era retirada para cada reator e ambas eram mensuradas, para manter o padrão experimental, evitando assim volatilização que ocorreria no caso de retirada de três ou mais alíquotas como visto durante a modificação da metodologia.

Além disso após a retirada de cada amostra, os reatores biológicos eram novamente vedados com silicone para impedir assim a perda do composto alvo através da volatilização pelas aberturas causadas nas tampas de borracha dos frascos de vidro.

4.6 MÉTODO ANALÍTICO PARA MENSURAÇÃO DOS BTEX.

A escolha da análise por cromatografia líquida de alta eficiência, foi feita por ser de maior facilidade quando comparado com cromatografia gasosa, principalmente devido ao grande número de amostras que foram analisadas, além disso as análises puderam ser padronizadas com mesmo volume de injeção. Apesar dos BTEX serem voláteis, os reatores foram mantidos e analisados em condições iguais para diminuir ao máximo a diferença que a volatilização poderia gerar nas análises.

Sendo assim, a metodologia final para análise em HPLC foi definida como fase móvel de 60% de acetonitrila, 40% de água deionizada, a coluna utilizada foi C18 da Merck, temperatura do forno definida em 40°C, fluxo de 1 mL/min, pressão e tempo de corrida de 13 minutos, os tempos de retenção de cada composto estão dispostos na **Tabela 2**.

Tabela 2. Tempo de retenção dos BTEX em minutos.

Compostos	Tempo de Retenção (minutos)
Benzeno	5,26
Tolueno	7,14
Etil-Benzeno	9,56
Xileno	10,21

Fonte: O Autor (2024).

Para curva de calibração dos BTEX, foi realizada a primeira diluição da solução estoque de 10g/L de BTEX em balão volumétrico de 5ml, na qual foi utilizado 100µL da solução estoque e 4,9ml de água deionizada, chegando na concentração de 200mg/L.

Após isso foram realizadas diluições dessa solução de 200mg/L de BTEX para construção da curva de calibração conforme mostra a **Tabela 3**.

Tabela 3. Volumes necessários para curva de calibração de BTEX para cada concentração.

Concentração BTEX para a curva analítica (mg/L)	Volume da solução estoque de 200 mg/L (µL)	Volume de água deionizada (µL)
5	25	975
10	50	850
25	125	875
50	250	750
75	375	625
100	500	500
125	625	375
150	750	250

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Foi então utilizado um *vial* para cada ponto de concentração da curva, na qual o volume final foi de 1ml. Primeiramente era adicionada a água deionizada no *vial* e depois o volume correspondente à solução de 200mg/L de BTEX, promovendo assim a melhor diluição. Estes *vials* foram então submetidos ao método analítico para BTEX em HPLC. Os valores de área obtidos por cada pico cromatográfico foram utilizados para se obter a equação reduzida da reta, permitindo assim obter as concentrações experimentais de BTEX nos reatores biológicos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESCOLHA DOS GENES, MONTAGEM DOS PLASMÍDEOS E TRANSFORMAÇÃO DE *ESCHERICHIA COLI*.

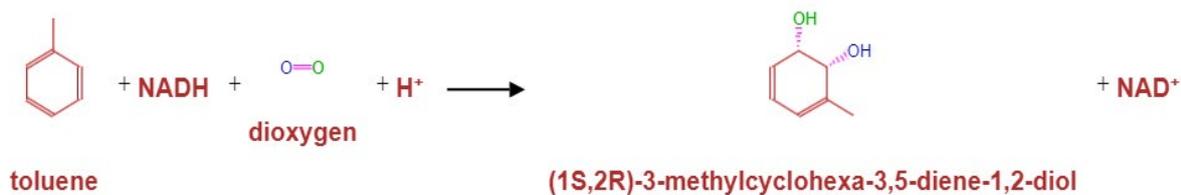
O vetor escolhido para o estudo foi o pET28a, este por sua vez possui o operon *lac*, responsável normalmente por produzir a lactase, capaz de quebrar a lactose em glicose e galactose, servindo assim como fonte de carbono para as células.

Neste estudo o operon *lac* foi o promotor utilizado para iniciar a transcrição de dois genes que originalmente pertencem a *Pseudomonas putida*, o **todC2** que sintetiza a enzima tolueno 1,2 dioxygenase capaz de inserir duas hidroxilas nos carbonos 1 e 2 do tolueno na **Figura 8**, este foi escolhido por fazer parte da rota de degradação do tolueno e também por degradar ser capaz de degradar outros hidrocarbonetos como mostra estudo de Suyama *et al.*, (1996), no qual foi capaz de degradar tricloroetileno, composto tóxico amplamente utilizado principalmente como solvente em diversos processos industriais e também são capazes de causar danos tanto à saúde humana quanto danos ambientais.

O gene **dmpB** foi escolhido por transcrever a enzima catechol 2,3 dioxygenase, esta que na presença das hidroxilas em anéis fenólicos é capaz de quebrar essas ligações, consequentemente efetuando a quebra do anel encontrado nos hidrocarbonetos alvo deste estudo **Figura 9**, estudos de Bartilson, Shingler, (1989) mostram que *Escherichia coli* é capaz de assimilar e expressar os plasmídeos que contém este gene.

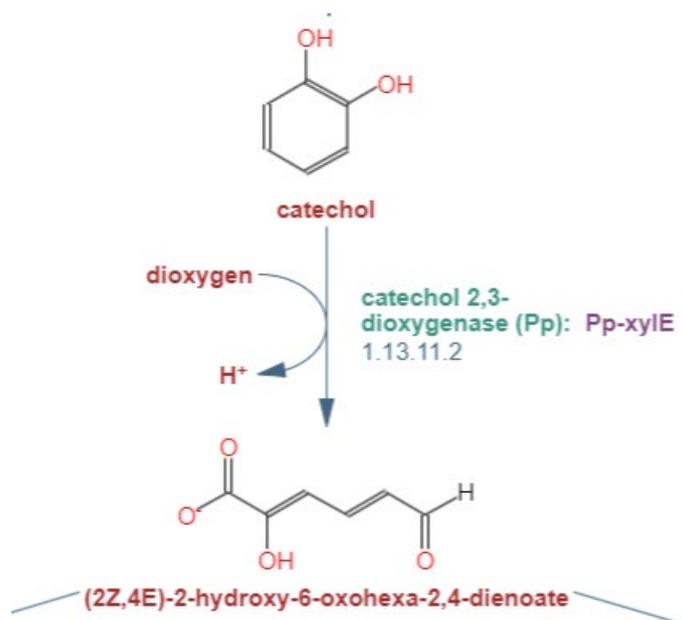
A rota de degradação do tolueno foi escolhida, pois durante o levantamento de dados a respeito dos genes necessários para degradação dos anéis fenólicos, esta apresentava menor número de enzimas necessários para esse fim, consequentemente necessitando de menos plasmídeos para transformação, isso é importante pois apesar de ser possível inserir mais de um gene no mesmo vetor, devido ao número elevado de pares de base (fator limitante) dos genes não foi possível incluir os dois genes de degradação mais o gene de resistência a antibiótico no mesmo plasmídeo, sendo assim foram necessários dois plasmídeos, um para cada gene de degradação.

Figura 8. Inserção das hidroxilas no tolueno, por meio da enzima tolueno 1,2 dioxygenase, sintetizada pelo gene todC2.



Fonte: ByoCyc.

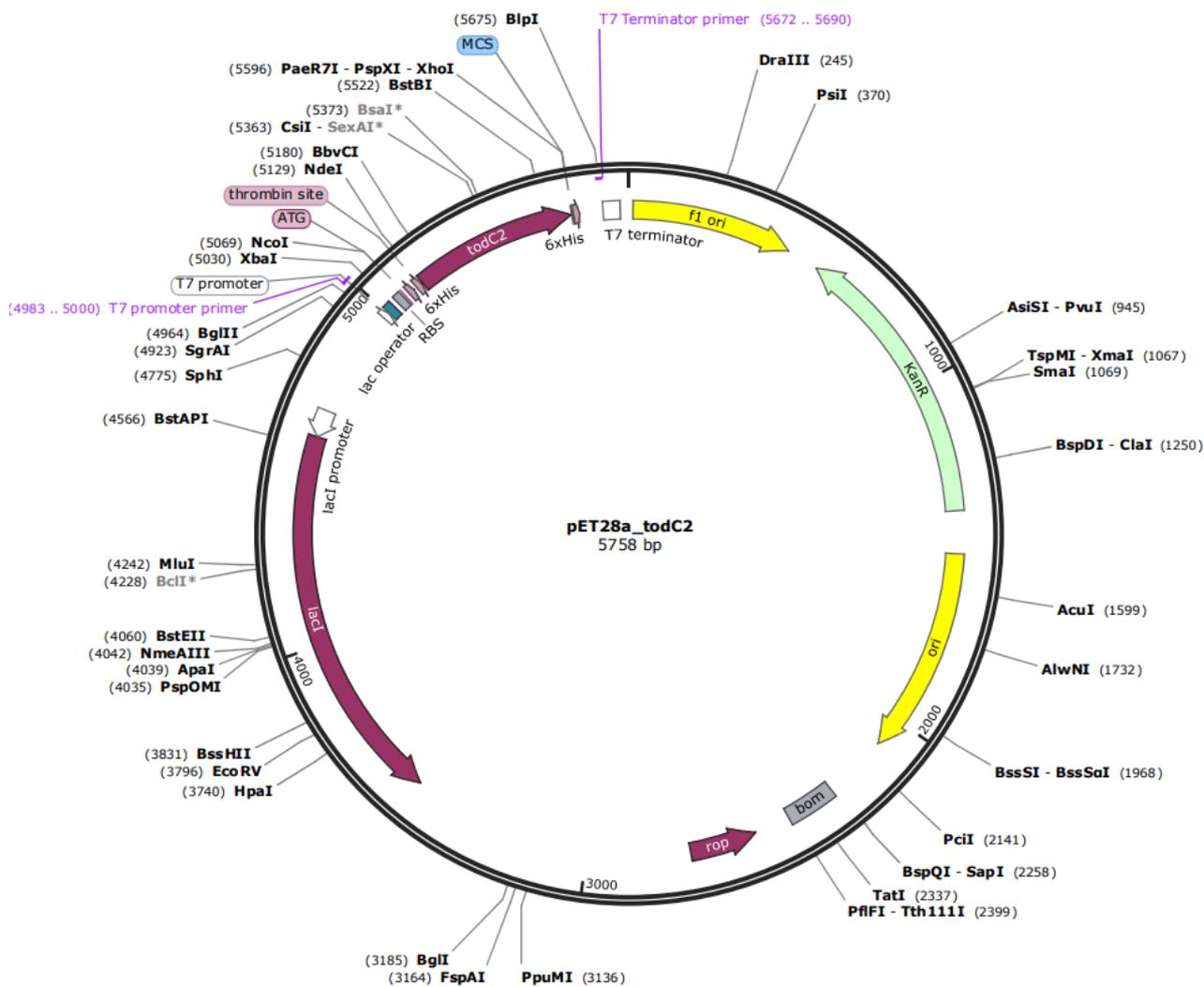
Figura 9. Quebra do anel aromático do catechol, por meio da enzima catechol 2,3 dioxygenase sintetizada pelo gene dmpB.



Fonte: ByoCyc.

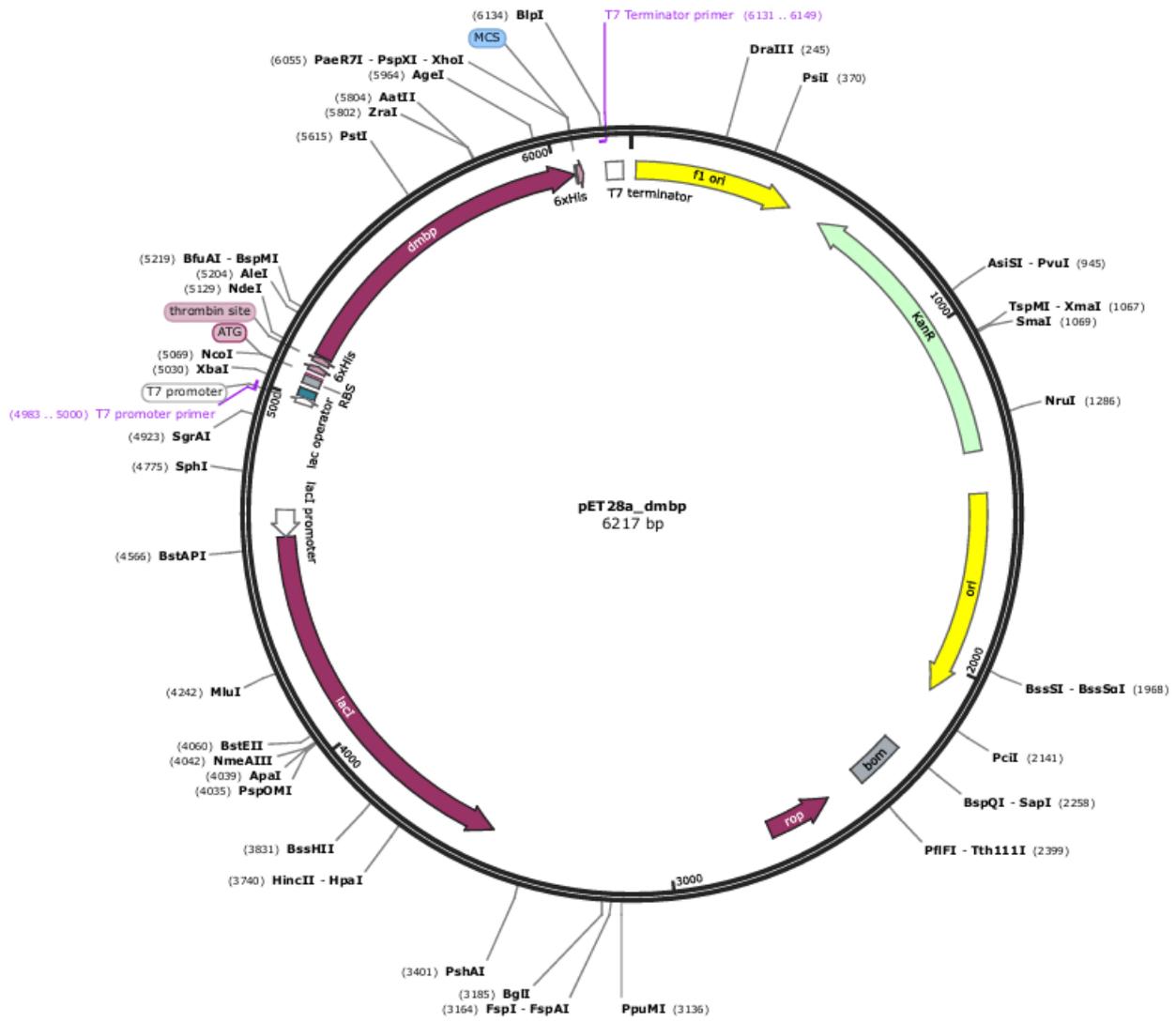
Após as escolhas dos genes, foi realizado o design, confecção e aquisição dos plasmídeos já montados pela empresa GOGENONE, na qual um plasmídeo contém o gene todC2 (**pET28a_todC2**) e o outro o dmpB (**pET28a_dmbP**), ambos os genes foram inseridos nos sítios NdeI e XhoI. Nos plasmídeos também foi inserido o gene kanR que confere resistência ao antibiótico canamicina, necessário para seleção das cepas transformadas com os vetores, as **Figuras 10 e 11** mostram o mapa de construção dos plasmídeos nos sítios de inserção para ambos os genes.

Figura 10. Design do plasmídeo responsável pelo gene todC2.



Fonte: O Autor (2024).

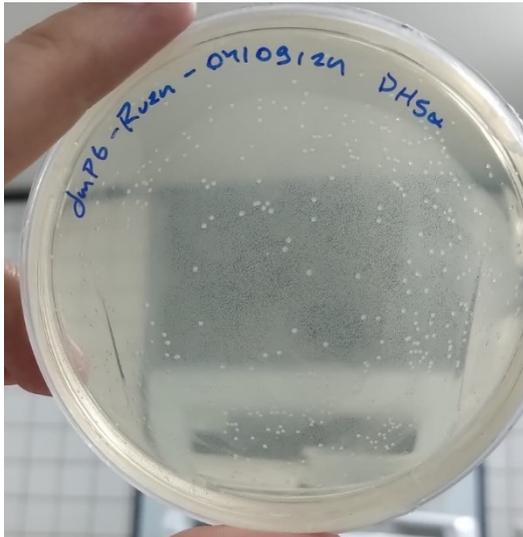
Figura 11. Design do plasmídeo responsável pelo gene dmpB.



Fonte: O Autor (2024).

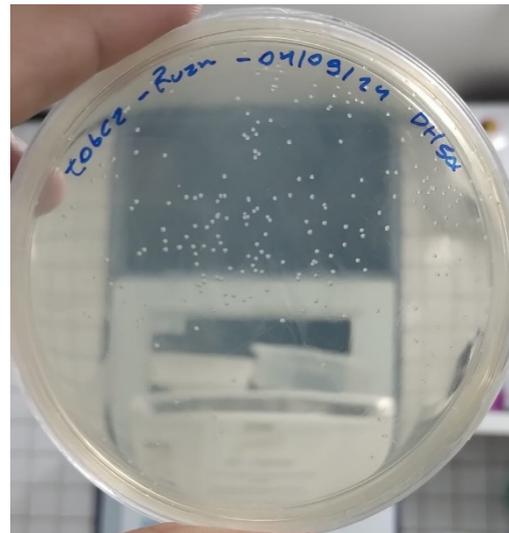
Após a transformação dos plasmídeos em *Escherichia coli*, foi realizado o plaqueamento em placa de petri com meio de cultura LB e adição de canamicina, como mostra as **Figura 12 e 13**, também foi preparado um controle negativo contendo suspensão de *E. coli* sem transformação com mesmo meio, na qual não houve crescimento.

Figura 13 Colônias de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo pET28A_dmbP.



Fonte: O Autor (2024).

Figura 12 Colônias de *Escherichia coli* transformadas com o plasmídeo pET28A_todC2



Fonte: O Autor (2024).

As colônias foram coletadas com auxílio de alça de platina, inoculadas em duplicatas para cada plasmídeo de reatores biológicos como mostra a **Figura 14**.

Figura 14. Reatores biológicos de crescimento em duplicata contendo *Escherichia coli* transformada para cada plasmídeo e meio com 80 μ L de solução estoque de 50 μ L/mL de canamicina.



Fonte: O Autor (2024).

Para montagem final dos reatores com adição do composto alvo, foi utilizada metodologia já descrita anteriormente, **Figura 15**.

Figura 15. Reatores biológicos contendo *Escherichia coli* transformada, ETMK- Controle Meio e Inóculo, ET50 – Inóculo e meio com 50mg/L de BTEX e 80 µL de 50 µL/mL de Canamicina.



Fonte: O Autor (2024).

5.2 ADAPTAÇÕES PARA METODOLOGIA ANALÍTICA DE BTEX NO HPLC

A metodologia base utilizada foi descrita por Mudhaffer, Ali, Risalah, (2018) e ASTM D6591-06, (2006), a partir dela foram realizados testes de composição de fase móvel, coluna e detector. Para padronizar as amostras foram realizadas diluições dos compostos Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno e Xileno em água deionizada até atingir a concentração de 2000 mg/L, para não saturar o detector do HPLC, foi realizada diluição até a concentração final de 500 mg/L, isso após outra diluição, com isso foi feita uma corrida cromatográfica de vinte minutos utilizando alíquotas de 1ml para cada composto, composição da fase móvel de 50% água deionizada e 50% de acetonitrila, fase estacionária coluna LICHROSPHER RP-C18 de 5µm, e detector DAD.

Após as corridas cromatográficas os tempos de retenção em minutos das amostras foi de 8 para Benzeno, 11 para Tolueno, 17 para Etil-benzeno e 18 para o Xileno. Posteriormente visando diminuir o tempo de análise das amostras foram testadas mais duas composições de fase móvel, só com o benzeno, na primeira composição se utilizou 30% de água deionizada e 70% de acetonitrila, com isso houve diminuição do tempo de retenção dos compostos em cerca de 1 minuto.

Outra composição da fase móvel foi de 60% acetonitrila e 40% de água, essa foi a melhor composição até então, na qual o tempo de retenção do Benzeno diminuiu de 8 minutos para 5, Tolueno de 11 para 7, Etil-benzeno de 17 para 9 e Xileno de 18 para 10, porém se fez necessário analisar os compostos juntos, em ambas as composições de fase móvel tanto de 70/30 como 60/40, com concentração de 500 mg/L de BTEX.

Para maior precisão foi necessária a análise imediata das amostras contendo BTEX após a coleta da alíquota, pois em alguns testes não foram detectadas as bandas cromatográficas referentes

ao Tolueno e Xileno, isso provavelmente se deu ao fato da solução mãe de 2000 µg/L ter sido preparada dois dias antes da análise, causando assim a volatilização de ambos os compostos, para verificar tal fato as amostras dos compostos isolados, preparadas no mesmo dia, foram novamente levadas ao HPLC e foi constatado que os picos cromatográficas eram significativamente menores do que as que foram analisadas minutos após a preparação das amostras.

Dessa forma para realizar novamente os testes dos compostos juntos, foi feita outra solução mãe de 2000 mg/L, diluição nos compostos isolados afim de chegar na concentração de 250 mg/L, sendo essa escolhida para verificar se o detector seria capaz de identificar menores concentrações dos compostos, posteriormente foram retiradas alíquotas de 0,25mL de cada composto e combinadas totalizando 1mL para realizar novamente análise no HPLC.

Com isso a corrida cromatográfica também foi programada para 20 minutos utilizando a fase móvel 60% de acetonitrila e 40% de água deionizada, desta vez foi possível observar os quatro picos cromatográfico, os tempos de retenção foram os mesmos das amostras isoladas testadas anteriormente, tornando-as possíveis de identificar.

É importante salientar que os picos cromatográficos referentes ao Etil-benzeno e Xileno tiveram resolução menor que a dos outros compostos, devido ao curto intervalo entre seus tempos de retenção.

Os últimos testes foram realizados também com detector UV-VIS, nas concentrações de 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L, que apresentou os mesmos resultados que o detector DAD testado anteriormente.

Os resultados dos testes vão de acordo com estudos realizados por AlSalka, Karabet, Hashem, (2010), que comparou a eficiência de análise de BTEX em HPLC com detector DAD, utilizando 100% de acetonitrila e GC-MS com nitrogênio, chegando conclusão que o método de análise de BTEX em HPLC é tão eficiente quanto no GC-MS, com menos custos operacionais e capacidade de detectar baixíssimas concentrações.

Entretanto a composição da fase móvel deve que ser definida baseada nas concentrações a serem analisadas dos compostos Candel, Estellés, Aucejo, (2009), no qual a fase móvel utilizada foi de 25% de água e 75% de metanol, demonstrou que é possível realizar a análise com este método em HPLC, porém o GC-MS é mais eficiente, além disso não é possível analisar o Benzeno em condições reais, isto é, concentrações desconhecidas, pois abaixo de 20 mg/L não foi possível quantificar o composto alvo devido à baixa sensibilidade do método para este composto.

A metodologia final foi definida com base na eficiência da relação entre o tempo de corrida cromatográfica e consumo de reagente, sendo ela então de volume de injeção 20 µL, fase móvel composta por 60% de acetonitrila e 40% de água deionizada, a coluna utilizada foi a C18 da Merck, temperatura do forno 40°C, fluxo de 1 mL/min e tempo de corrida de 13 minutos **Tabela 4.** Os

tempos de retenção dos compostos foram: Benzeno – 5,26 minutos, Tolueno – 7,14 minutos, Etil-Benzeno – 9,56 minutos e Xileno 10,20 minutos.

Tabela 4. Parâmetros para análise de BTEX em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Parâmetros - Análise de BTEX em HPLC	Valores
Fase Móvel	60% - Acetonitrila, 40% -Água
Coluna	C18
Temperatura do Forno	40°C
Duração da Análise	13 minutos
Volume de Injeção	20 µL
Fluxo	1 mL/min
Detector	UV-VIS

Fonte: O Autor (2024).

5.3 CURVA DE CALIBRAÇÃO DOS COMPOSTOS ALVOS EM HPLC

Após as amostras das curvas serem analisadas no HPLC, foram obtidos os seguintes valores de área para cada composto, como mostra a **Tabela 5**.

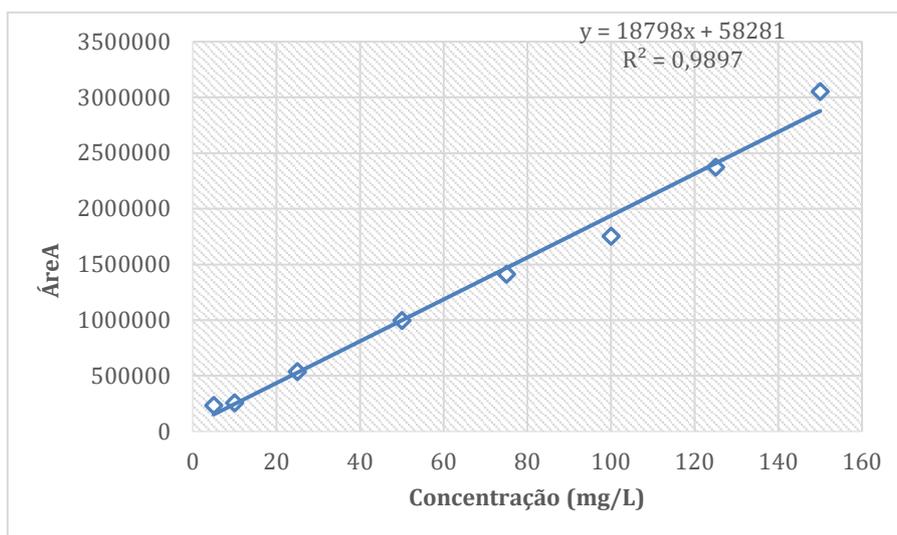
Tabela 5. Valores de área para cada concentração de BTEX.

Concentração de BTEX (mg/L)	Benzeno (Área)	Tolueno (Área)	Etil-Benzeno (Área)	Xileno (Área)
5	233266	466692	311968	320515
10	256024	447869	303775	341558
25	537753	903391	523709	573072
50	997106	1805012	1149305	1295965
75	1413753	2710414	1733616	1967034
100	1752834	3577827	2689674	3094058
125	2373848	4667379	3102908	3531722
150	3052552	5864968	4015340	4561431

Fonte: O Autor (2024).

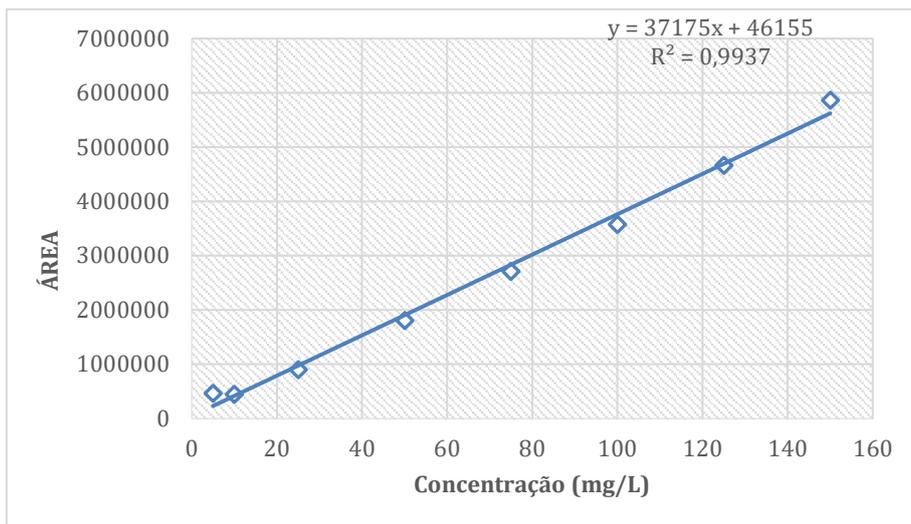
Os valores de área de cada composto foram tabulados separadamente para obter a equação reduzida da reta e o coeficiente de correlação quadrática (R^2) de cada composto **Figuras 16, 17, 18, 19**, para efeito de comparação foram também plotados no mesmo gráfico **Figura 20**.

Figura 16. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Benzeno.



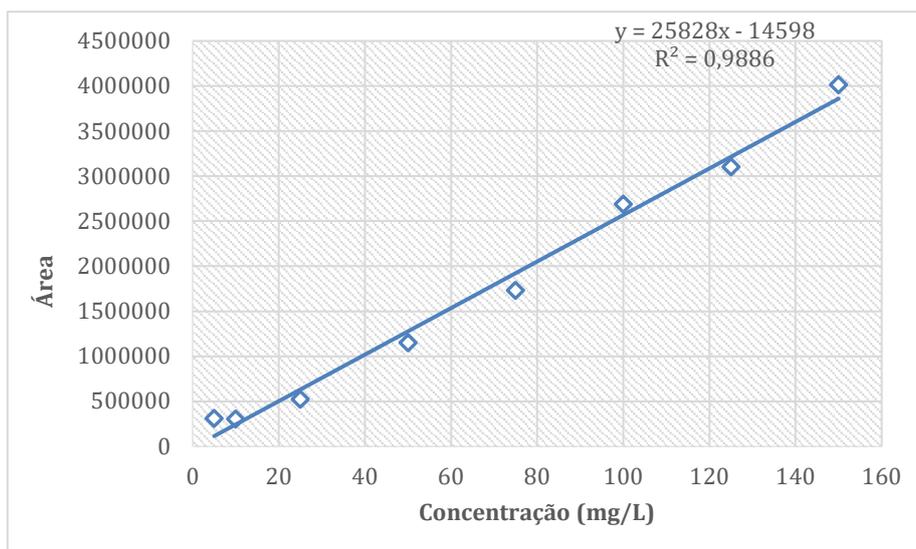
Fonte: O Autor (2024).

Figura 17. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Tolueno.



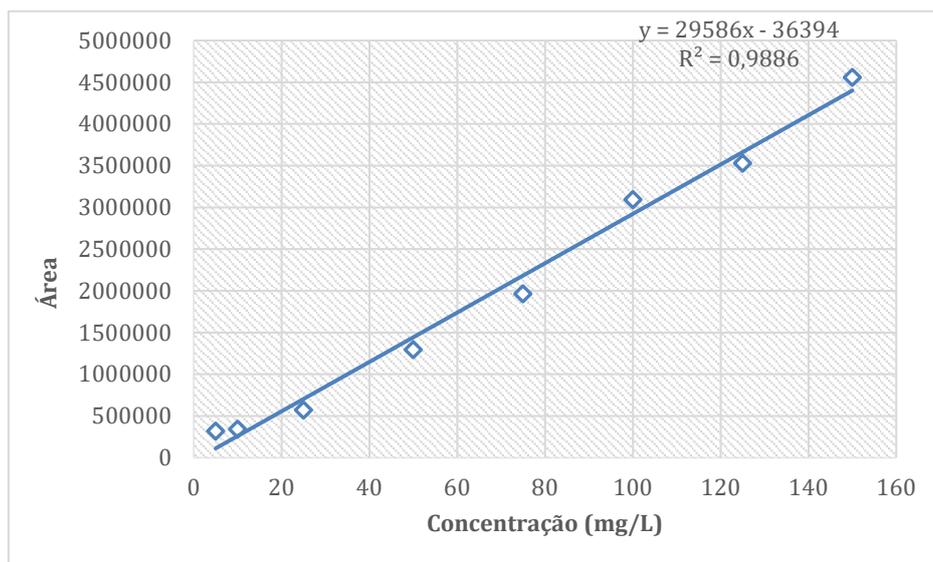
Fonte: o Autor (2024).

Figura 18. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Etil-Benzeno.



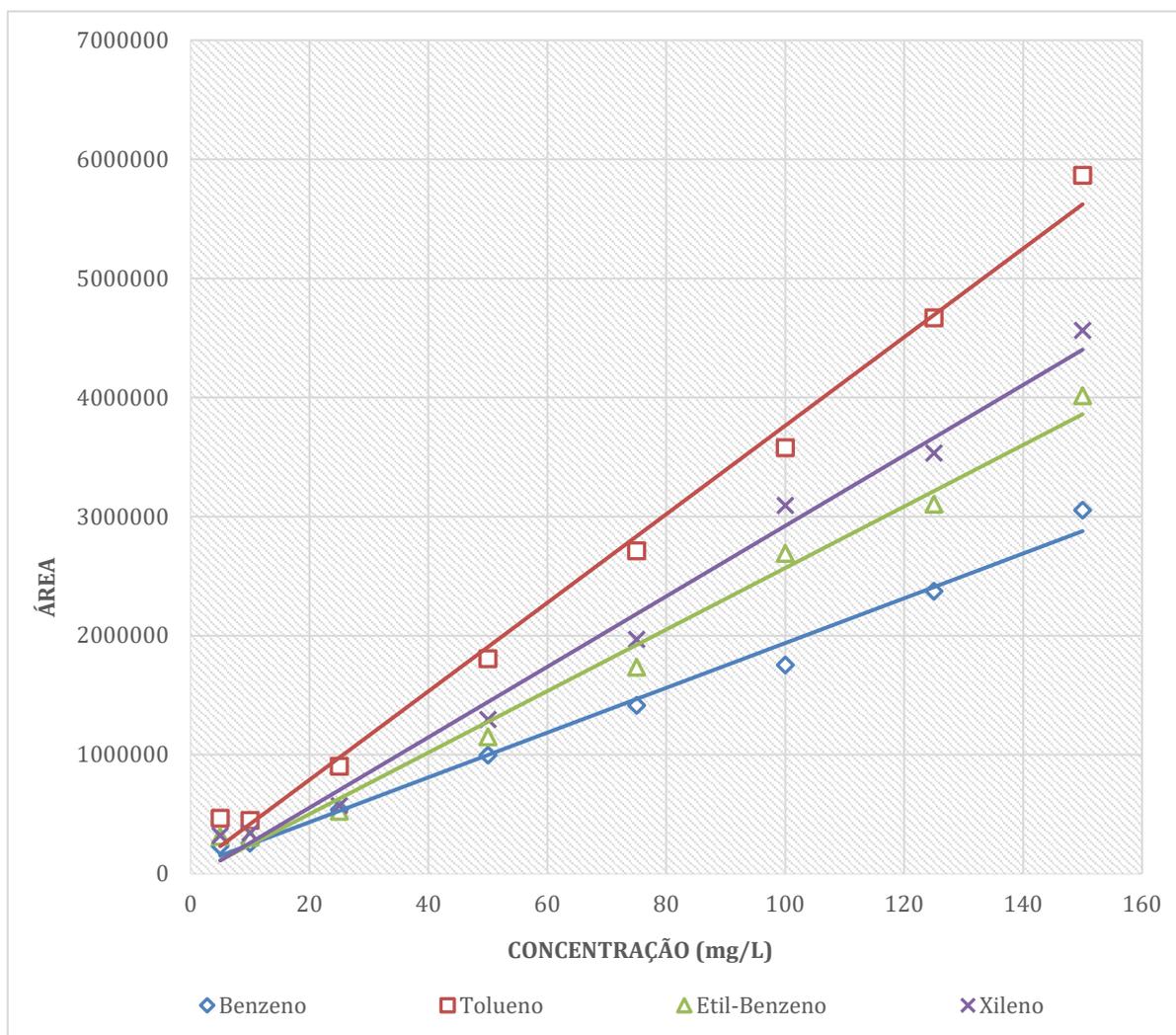
Fonte: o Autor (2024).

Figura 19. Curva analítica para o hidrocarboneto aromático Xileno.



Fonte: o Autor (2024).

Figura 20. Curva analítica dos hidrocarbonetos aromáticos (BTEX) em HPLC.



Fonte: o Autor (2024).

Com as equações reduzidas da reta $y = ax + b$, onde y são os valores de área obtidos em cada reator biológico e x o valor de concentração dos compostos em mg/L, foi possível determinar as concentrações dos compostos ao longo do experimento.

5.4 TAXA DE CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento dos microrganismos foi medido por meio de espectrômetro, utilizando cubeta de quartzo, a partir dos resultados de absorvância foram plotados os gráficos com os resultados de crescimentos nas concentrações de 50mg/L, 100mg/L e 150mg/L de BTEX, ao decorrer de 240 horas experimentais, também foi mensurada a velocidade de crescimento específica dos reatores.

Os gráficos foram divididos por espécies em cada concentração testada de BTEX, para isso foi atribuída nomenclatura com abreviação do nome da espécie, seguido da concentração dos compostos aromáticos, 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L ao qual foram submetidas ou a sigla Con para os controles sem BTEX, sendo assim: EC – *Escherichia coli*, PSD – *Pseudomonas Aeruginosa*, ENT – *Enterobacter ludwigii*, ECT – *Escherichia coli* transformada com os plasmídeos e BRANCO – Meio de cultura sem inóculo ou adições.

Na **Figura 21**, mostra a cinética de crescimento das cepas de *Escherichia coli* (EC), na qual a taxa de crescimento (turbidez), variou bastante entre os reatores, no controle positivo de *Escherichia coli* (ECM), o crescimento ocorreu de maneira muito rápida nas primeiras 24 horas, apresentando 478 de absorvância (ABS), esse valor se manteve estável até o fim das 240 horas do experimento, por isso não foi possível traçar linha de tendência condizente com o crescimento, logo devido ao alto distanciamento entre os dois primeiros pontos não foi possível calcular com precisão sua velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}), apesar disto os dados tabulados foram similares aos de Sezonov, (2007), que mediu a fisiologia do crescimento de *Escherichia coli* em meio Luria-Bertani.

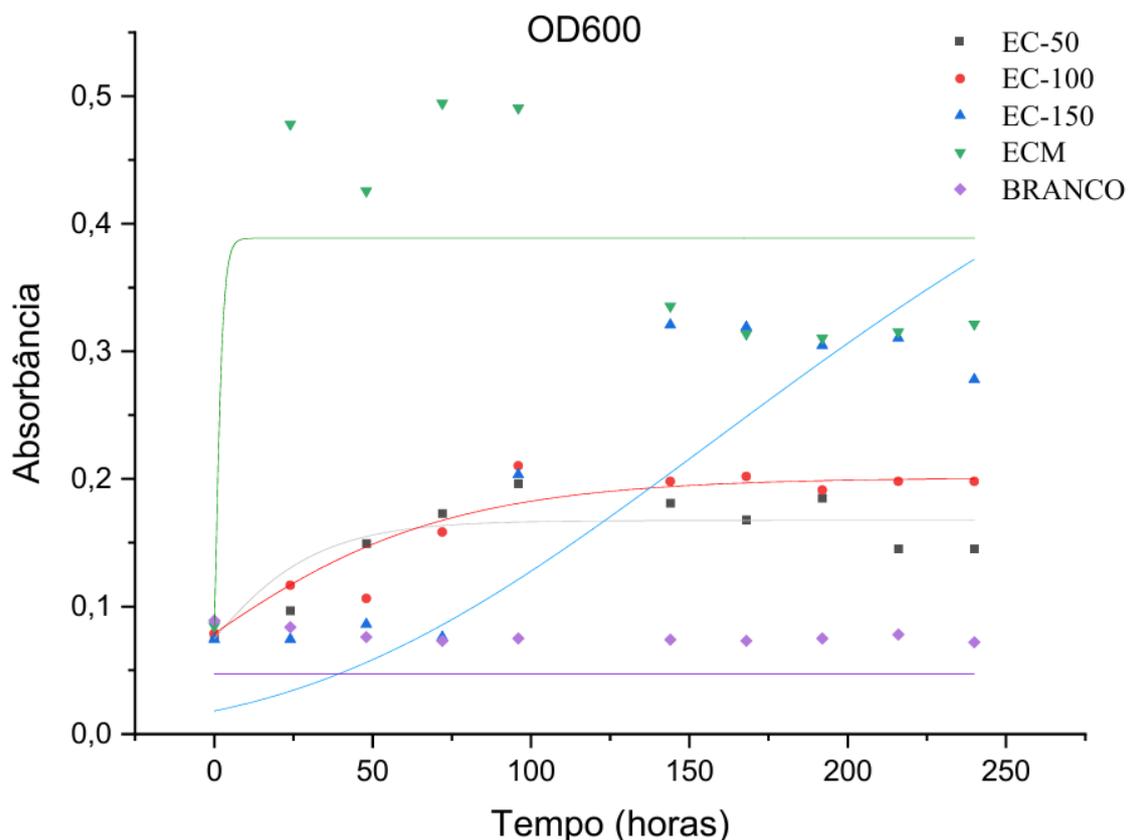
A cinética de crescimento na presença das três concentrações de compostos está de acordo com estudo realizado por Xu, Mulchandani, Chen, (2003.). Os dados também são similares aos de Ricoy *et al.*, (2012), que realizou a transformação plasmídeos em *Escherichia col*, provenientes de espécies do gênero *Pseudomonas* com solos contaminados por petróleo, na qual é realizado o teste de crescimento em meio mineral com adição de 0,05% de antraceno como única fonte de carbono.

No presente estudo entretanto, mostra-se melhor cinética de crescimento de *Escherichia coli* (EC) com o aumento da concentração de BTEX, principalmente na concentração de 150 mg/L, porém os valores de crescimento máximo (absorvância) foram menores que o controle positivo nas três concentrações testadas.

Escherichia coli com adição de 50 mg/L dos compostos alvos (EC-50) obteve o crescimento máximo de 196 ABS (absorbância), diferença de 59% em relação a ECM (*Escherichia coli* controle), para *Escherichia coli* com adição de 100 mg/L dos hidrocarbonetos monoaromáticos (EC-100) o valor máximo de crescimento obtido foi de 210 ABS, cerca de 7% maior que EC-50 e 56% menor que ECM.

Por último *Escherichia coli* na concentração de 150 mg/L de BTEX (EC-150), obteve o valor máximo absoluto de 320 ABS, aproximadamente 33% menor que ECM e 52% maior que EC-50 e EC-100, foram encontrados outros estudos similares com degradação de BTEX, porém sem análise de cinética de crescimento para efeito de comparação.

Figura 21. Crescimento de *Escherichia coli*, na qual EC- 50: E. coli, 50mg/L de BTEX. EC- 100: E. coli, 100mg/L de BTEX. EC- 150: E. coli, 150mg/L de BTEX. EC- Con: E. coli e Meio de Cultura sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.



Fonte: O Autor (2024).

Nota-se que *E. Coli* em meio sem a presença de BTEX (ECM) obteve o maior crescimento absoluto, porém a menor velocidade específica de crescimento com apenas $1,00 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ devido ao intervalo de medida nas primeiras 24 horas, no qual ocorreu a maior taxa de crescimento **Tabela 6**.

Reforçando os resultados tabulados no gráfico, nas três concentrações testadas houve boa cinética de crescimento, porém com o aumento da concentração, houve também aumento na velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}), *Escherichia coli* em 50 mg/L dos hidrocarbonetos aromáticos (EC-50) obteve $2,00 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, na concentração de 100 mg/L de BTEX (EC-100) obteve $3,40 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e em adição de 150 mg/L (EC-150) obteve $7,40 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$.

O Branco foi mensurado como controle de crescimento negativo, no qual era composto apenas por meio de cultura, este não foi utilizado na tabela, pois como não houve crescimento, não foi possível calcular o μ_{max} .

Tabela 6. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.

Reatores Biológicos	$\mu_{max}(\text{h}^{-1})$
EC- 50	$2,00 \cdot 10^{-3}$
EC-100	$3,40 \cdot 10^{-3}$
EC-150	$7,40 \cdot 10^{-3}$
ECM	$1,00 \cdot 10^{-3}$

Fonte: O Autor (2024).

Já *Enterobacter ludwigii*, houve grande variação em seu crescimento quando comparado a *E. coli*, como pode ser visualizado na figura **Figura 22**, é possível observar que praticamente não houve variação entre *Enterobacter ludwigii* controle (ENTM) que obteve valor máximo absoluto de 507 de absorvância (ABS) , enquanto *Enterobacter ludwigii* submetida a 50 mg/L dos compostos aromáticos (ENT-50) em reatores biológicos atingiu 425 de absorvância (ABS), diferença essa de aproximadamente 20%, provavelmente isso ocorre pelo fato desta espécie conseguir degradar baixas concentrações de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA), como foi citado em estudo realizado por (Yousaf *et al.*, 2011).

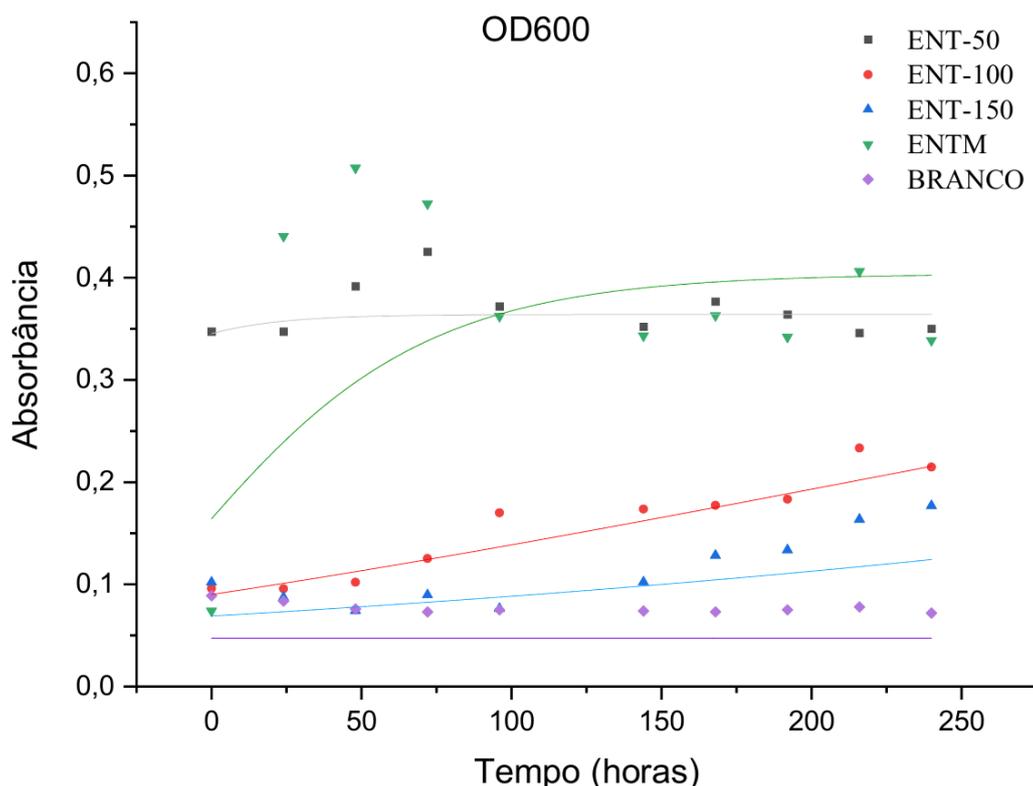
Essa espécie também é capaz de degradar metais pesados como o cádmium e suportar amplo espectro de condições como temperatura, pH, salinidade, mantendo sua eficiência de crescimento e degradação (Amraoui *et al.*, 2021; Xiao *et al.*, 2024).

Logo devido sua capacidade de adaptação a grande variedade de ambientes estressantes, *E. ludwigii* foi capaz de degradar as baixas concentrações de BTEX, todavia quanto maior a concentração de BTEX menor foi o crescimento máximo (absorvância), no qual é possível observar que *Enterobacter ludwigii* submetida a 100 mg/L dos compostos aromáticos (ENT-100) obteve valor máximo de crescimento de 233 ABS enquanto *Enterobacter ludwigii* em 150 mg/L (ENT-150) obteve valor máximo de crescimento de 177 ABS até as 240 horas finais do experimento, diferença de 45% e 65% quando comparado com ENTM e ENT-50.

Se comparado a *E. Coli*, *Enterobacter ludwigii* controle (ENTM) e ENT-50, obtiveram valores de crescimento máximo absoluto muito próximos a ECM e EC-50, nota-se quanto maior a

concentração do composto alvo, *Escherichia coli* se mostrou mais tolerante, principalmente com adição de 150 mg/L de BTEX obteve valor de crescimento aproximadamente 45% maior que *Enterobacter ludwigii* na mesma concentração.

Figura 22. Crescimento de *Enterobacter ludwigii*, ENT- 50: *E. ludwigii* e 50mg/L de BTEX. ENT- 100: *E. ludwigii*, 100mg/L de BTEX. ENT- 150: *E. ludwigii*, 150mg/L de BTEX. ENT- Con: *E. ludwigii* e Meio de Cultura Sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.



Fonte: O Autor (2024).

É possível atestar também que as velocidades máximas específicas de crescimento (μ_{max}) de ENTM e ENT-50 apresentaram apenas 8% de diferença, sendo elas respectivamente de $2,30 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ e $2,10 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, a maior μ_{max} foi de ENT-100 com $3,80 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$, cerca de 26% maior se comparado com ENT-150 que obteve a segunda maior velocidade máxima específica de crescimento de $3,00 \cdot 10^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, apesar disso a comparação não pode ser feita diretamente entre ENTM e ENT-50 com ENT-100 e ENT-150, tendo em vista que seguindo o mesmo padrão de *Escherichia coli*, o controle e o reator com menor concentração, obtiveram altos valores de ABS nas primeiras 24 horas, caso o crescimento fosse medido a cada hora, provavelmente o μ_{max} delas seria maior que os das maiores concentrações, **Tabela 7.**

Em relação ao μ_{max} , EC-150 se mostrou consideravelmente mais tolerante que ENT-150, com diferença de 160% no crescimento, entretanto na concentração intermediária ENT-100 obteve valor de μ_{max} 11% maior que EC-100.

Tabela 7. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.

Reatores Biológicos	$\mu_{max}(h^{-1})$
ENT-50	$2,30^{-03}$
ENT-100	$3,80^{-03}$
ENT-150	$3,00^{-03}$
ENTM	$2,10^{-03}$

Fonte: O Autor (2024).

Na **Figura 23**, foi possível verificar que o crescimento (ABS) de *Pseudomonas aeruginosa* foi mais elevado no reator controle sem a adição de BTEX (PSDM) que obteve 1300 de ABS, assim como na menor concentração de BTEX testada 50mg/L (PSD-50) que obteve o valor máximo absoluto de crescimento de 1253 ABS, diferença essa de apenas 3%.

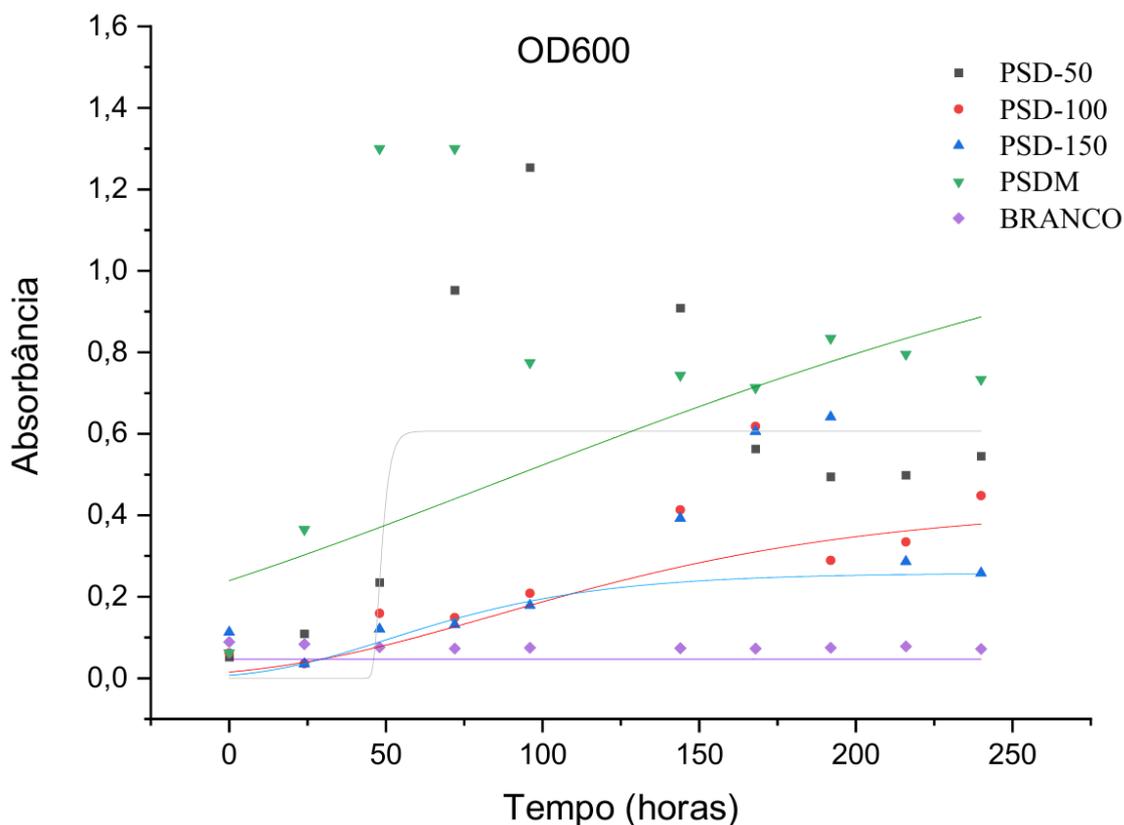
Pode-se constatar que a cinética de crescimento de *P. aeruginosa* foi semelhante à *E. ludwigii*, no qual os maiores valores máximos absoluto de crescimento foram obtidos no controle positivo PSDM e na menor concentração testada PSD-50, nas concentrações de 100 mg/L (PSD-100) e 150 mg/L (PSD-150) dos compostos alvos, os valores máximos de crescimento absoluto, foram de respectivamente 618 ABS e 641 ABS, diferença de apenas 4% entre elas, porém se comparado a PSDM e PSD-150 a diferença variou entre 95% a 110%.

Os resultados estão de acordo com dados obtidos por Mukherjee, Bondoloi, (2012), no qual o maior crescimento de *P. aeruginosa* na ausência de compostos aromáticos ocorre nas primeiras 72 horas.

Trabalho realizado por Safdari *et al.*, (2016), mostra que o crescimento de *P. aeruginosa* na presença de compostos aromáticos, através de substrato contaminado com óleo diesel, começa a partir das 120 horas, começando a estabilizar a partir de 480 horas, além disso consegue remover 90% dos hidrocarbonetos ao final das 480 horas, com 50% de eficiência de remoção em 192 horas.

Corroborando com o presente estudo e os outros trabalhos citados, Magdby *et al.*, (2022), descreve que essa espécie é capaz de degradar HPA como o antraceno e Mukherjee, (2012), mostra a mesma é muito eficiente na degradação de BTEX, principalmente na presença de alguns sais.

Figura 23. Crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, na qual PSD- 50: *P. aeruginosa*, 50mg/L de BTEX. PSD- 100: *P. aeruginosa*, 100mg/L de BTEX. PSD-150: *P. aeruginosa*, 50mg/L de BTEX. PSD- Con: *P. aeruginosa* sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.



Fonte: O Autor (2024).

Nota-se com base na **Tabela 8**, que os valores de μ_{max} obtidos por *Pseudomonas aeruginosa* foram pelo menos 24% maiores que *Escherichia coli* e *Enterobacter ludwigii* em todas as concentrações testadas, o que mostra elevada capacidade de crescimento ao longo do tempo em todas as concentrações de BTEX.

Estudos feitos por Lin *et al.*, (2007), realizou testes de degradação para diversos compostos por *Pseudomonas aeruginosa* e foi observado que houve diminuição na degradação dos substratos quando era adicionado BTEX no meio reacional, mesmo em baixas concentrações dos compostos aromáticos como 20 mg/L e 40 mg/L, isso pode indicar toxicidade por parte do BTEX inibindo a degradação dos outros compostos ou a mudança metabólica de *P. aeruginosa* para expressão de enzimas responsáveis pela degradação dos compostos aromáticos, podendo ser tanto para utilização como fonte de carbono ou defesa contra toxicidade dos BTEX.

Tabela 8. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.

Reatores Biológicos	$\mu_{max}(1/h)$
PSD-50	7,10E-03
PSD-100	9,20E-03
PSD-150	8,10E-03
PSD-Con	4,90E-03

Fonte: O Autor (2024).

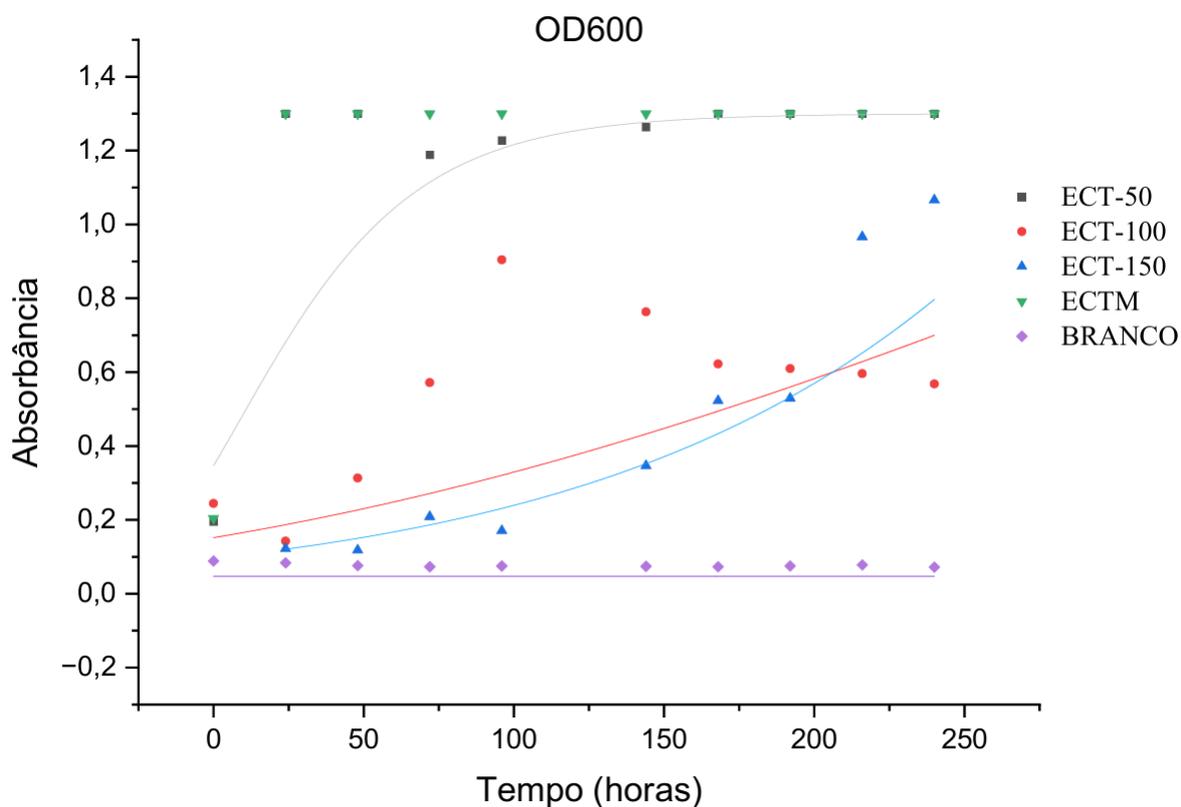
Por fim *Escherichia coli* transformada com os plasmídeos degradadores de BTEX (ECT), obtivem durante o experimento os maiores valores de crescimento máximo absoluto, *Escherichia coli* na concentração de 50 mg/L dos compostos alvo (ECT-50) obteve valor máximo de crescimento absoluto de 1300 ABS, em reatores com 100 mg/L de concentração (ECT-100) obteve 904 de ABS e principalmente na maior concentração de 150 mg/L (ECT-150), obteve valor máximo de crescimento absoluto de 966 ABS, pode-se observar na **Figura 24**.

É possível atestar que assim como *E. ludwigii* e *P. aeruginosa*, tanto a cinética de crescimento quanto os valores de ABS obtidos por *Escherichia coli* transformada com os plasmídeos foram muito semelhantes entre o controle (ECTM) e o reator biológico com 50 mg/L de concentração de BTEX (ECT-50), além disso a cepa recombinante também obteve melhor cinética de crescimento e valores de ABS superiores as outras cepas testadas nas concentrações de 100 mg/L e 150 mg/L, na qual a diferença se comparado com *E. coli* sem transformação, *E. ludwigii* e *P. aeruginosa* foi de pelo menos 50%, chegando até a 445% de diferença contra ENT-150.

Low *et al.*, (2013), demonstra que o maior crescimento de *Escherichia coli* em diferentes meios de cultura sem adição de outros compostos, ocorre entre 24 horas e 96 horas, a partir da inoculação nos reatores biológicos, também é possível observar que não há muita variação na cinética de crescimento em três meios de cultura testados BHI, LB e NB.

Estudos de Bartilson, Shingler, (1989) mostram expressão gênica da enzima catecol 2,3 dioxygenase através da inserção de plasmídeo em *E. coli*, além disso o trabalho feito por Ricoy *et al.*, (2012), mostra que cepas de *E. coli* DH5 α conseguem obter a capacidade de degradar hidrocarbonetos poliaromáticos através da transformação por eletroforese dos plasmídeos de bactérias isoladas de solo contaminado com petróleo, permitindo assim o crescimento em meio com antraceno mais combustível diesel e degradação de ambos os compostos.

Figura 24. Crescimento de *Escherichia coli*. ECT- 50: *E. coli* transformada, 50mg/L de BTEX. ECT- 100: *E. coli* transformada, 100mg/L de BTEX. EC- 150: *E. coli* transformada, 150mg/L de BTEX. ECT- Con: *E. coli* transformada e Meio de Cultura sem BTEX e Branco: Meio de Cultura.



Fonte: O Autor (2024).

Os valores de velocidade máxima específica de crescimento também foram mensurados como observado na **Tabela 9**, na qual o controle (ECTM e ECT-50, obtiveram valores de μ_{max} muito próximos, respectivamente $3,70^{-3} h^{-1}$ e $3,50^{-3} h^{-1}$, diferença de 6%.

Entre ECT-100 e ECT-150 os valores de μ_{max} foram $4,50^{-3} h^{-1}$ e $7,60^{-3} h^{-1}$ respectivamente, aproximadamente 69% de diferença. Apesar de ter obtido os maiores valores de crescimento absoluto entre todas as cepas, os valores de μ_{max} de ECT foram inferiores a PSD em todas as concentrações, provavelmente decorrente ao maior tempo que ECT necessitou para seu crescimento, esse fator é importante, pois quanto mais rápido a cepa é capaz de degradar o poluente, menor tempo de exposição do composto no ambiente.

Nota-se que ECT-50 apresentou valor máximo absoluto de crescimento nas primeiras 24 horas, assim como os controles ECTM, ECM, ENTM, PSDM e as menores concentrações testadas EC-50 e ENT-50, que também obtiveram valores de ABS altos nas primeiras 24 horas, se fazendo necessário neste período medir o crescimento a cada hora.

Esses resultados são condizentes com dados obtidos por Gill *et al.*, (2001), que mostra o aumento na fase de adaptação (lag) de *Escherichia coli* quando submetida a condições mais estressantes como temperatura,

Tabela 9. Reatores e suas respectivas velocidade máxima específica de crescimento.

Reatores Biológicos	$\mu_{max}(h^{-1})$
ECT-50	$3,70^{-3}$
ECT-100	$4,50^{-3}$
ECT-150	$7,60^{-3}$
ECTM	$3,50^{-3}$

Fonte: O Autor (2024).

5.5 DEGRADAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS MONOAROMÁTICOS

Os dados obtidos a partir das áreas dos cromatogramas de todas as triplicatas, foram utilizados para calcular as concentrações ao longo das 240 horas de experimento, bem como a eficiência de degradação dos compostos alvo, o residual de composto nos reatores e a velocidade de remoção do composto.

Os gráficos e dados de degradação foram separados para cada composto, facilitando assim a apresentação dos resultados e discussão com estudos já existentes.

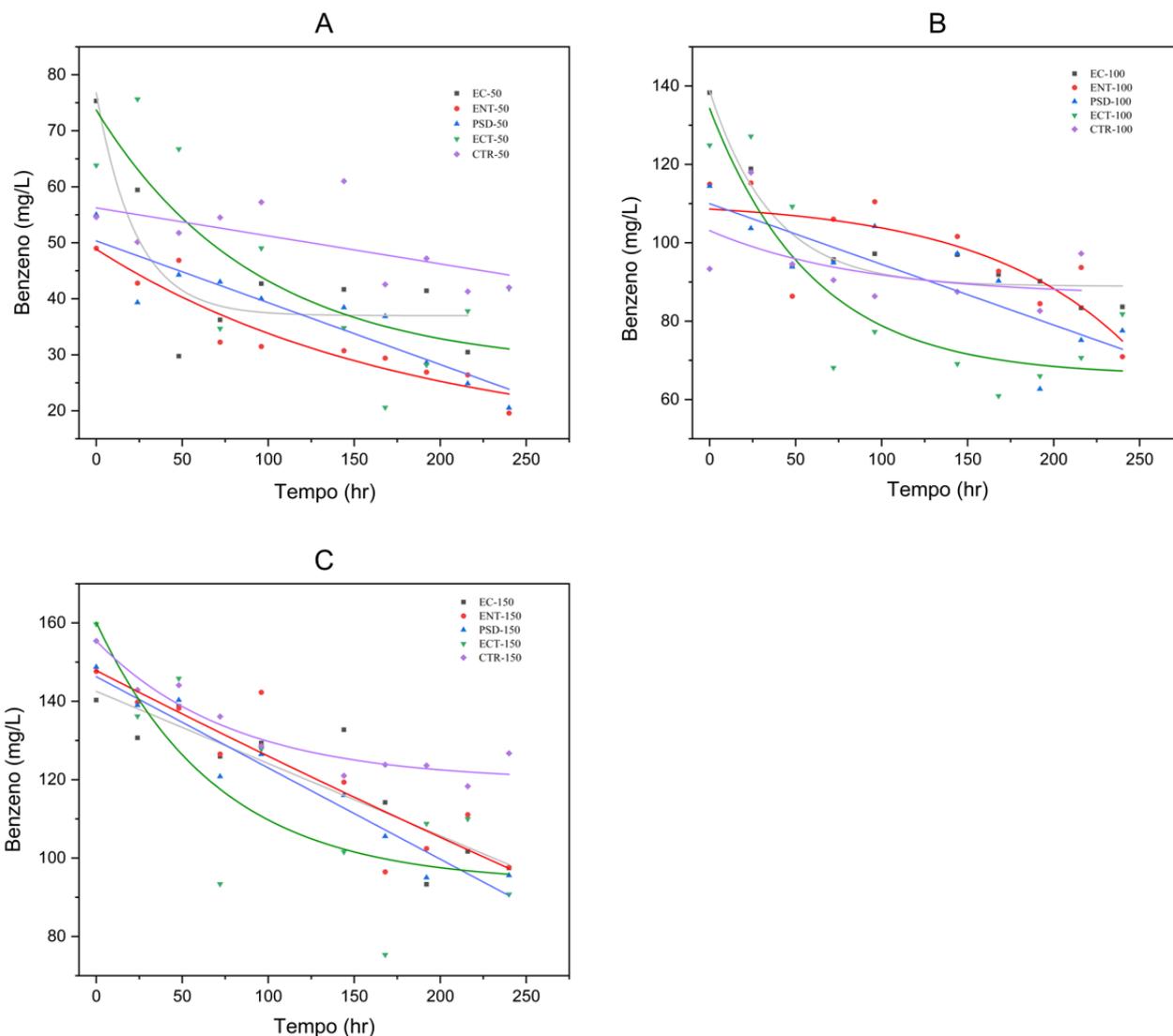
5.5.1 BENZENO NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 MG/L, 100 MG/L E 150 MG/L

O Benzeno ao longo do experimento foi o que se manteve mais resistente a remoção ou degradação do meio, possivelmente por ser o mais recalcitrante entre os BTEX, ainda assim todas as cepas microbianas estudadas conseguiram degradar em todas as concentrações.

Foi possível ser observada a degradação do Benzeno na **Figura 25**, na concentração de 50 mg/L do composto alvo recombinantes *Pseudomonas aeruginosa* (PSD-50) e *Enterobacter ludwigii* (ENT-50) obtiveram ótima cinética de degradação, nota-se também na **Tabela 10**, ao qual elas conseguiram respectivamente 63% e 60%, *Escherichia coli* (EC-50) obteve a maior eficiência de degradação das cepas testadas para 3 dias com 52% e 10 dias com 74% de eficiência de remoção de Benzeno, apesar disso PSD-50 e ENT-50 obtiveram valor da concentração residual do composto (y_0) muito menor que EC-50, respectivamente 12 mg/L e 14 mg/L.

Para maiores concentrações como 100 mg/L e 150 mg/L, ENT-100 e ENT-150, obtiveram metade dos valores eficiência de remoção, para três dias a eficiência foi de respectivamente 8% e 14% e com 10 dias a eficiência obtida foi de 38% e 34%, quando comparado a ENT-50, os valores residuais do composto também foram consideravelmente maiores, sendo de 110 mg/L para ENT-100 e 78 para ENT -150.

Figura 25. Degradação do Benzeno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Não foram encontrados estudos de cinética de degradação ou crescimento de *Enterobacter ludwigii* na presença de BTEX, apesar disso dados de Xiao *et al*, (2024) sugerem que a espécie é eficiente na degradação de metais pesados e hidrocarbonetos poliaromáticos como o fenantreno (Zhang *et al*, 2012), indicando assim junto com os resultados do presente estudo que para baixas concentrações de Benzeno < 50 mg/L, *E. ludwigii* possui alta eficiência de remoção do composto.

Pseudomonas aeruginosa também obteve cerca de metade da eficiência de remoção em 10 dias em concentrações de 100 mg/L (PSD-100) e 150 mg/L (PSD-150), quando comparado com PSD-50, também houve aumento quanto aos valores residuais do composto com 78 mg/L para PSD-100 e 92 mg/L para PSD-150, apesar disto a velocidade de remoção do composto foi parecida entre PSD-50 com 46 mg/L.h⁻¹ e 52 mg/L.h⁻¹ para PSD-150, já PSD-100 obteve o valor de 78 mg/L.h⁻¹.

Os resultados de *Pseudomonas aeruginosa* estão similares a estudos feitos por Lin, Cheng, Tsai, (2007) e Mukherjee, Bordoloi, (2012), este último no qual *P. aeruginosa* foi capaz de remover 65% do benzeno em 120 horas de experimento e de 75% com adição de nitrogênio (N) e fosfato (F).

Escherichia coli sem plasmídeo se mostrou mais eficiente na remoção do composto alvo que todas as outras cepas na concentração de 50 mg/L (EC-50), entretanto a eficiência de remoção diminuiu entre 20% e 40% em ambos os períodos nas concentrações de 100 mg/L e 150 mg/L, obteve também maior valor residual do composto chegando a quase três vezes mais quando se compara EC-50 com EC-150, a velocidade de remoção foi parecida entre EC-50 e EC-100, com respectivamente 40 mg/L.h⁻¹ e 49 mg/L.h⁻¹ totalizando cerca de 20%, porém comparado com EC-150 que obteve 10mg/L.h⁻¹ a diferença atingiu 360%.

Segundo Díaz *et al.*, (2001), *Escherichia coli* sem transformação de plasmídeos é capaz de degradar compostos aromáticos, inclusive realizando a clivagem do anel aromático na rota de degradação do catecol através de duas enzimas MhpB e HpaD (HpcB), resultando em Acetyl-CoA.

Escherichia coli transformada com os plasmídeos na concentração de 50 mg/L de Benzeno (ECT-50), obteve em três dias valor de eficiência de remoção de 46%, 6% menos eficiência que EC-50, entretanto deixou menos residual do composto, cerca de 9 mg/L a menos e sua velocidade de remoção foi ligeiramente maior, com 6 mg/L.h⁻¹.

Com o aumento da concentração do composto alvo para 100 mg/L, nota-se que quanto maior a concentração melhor é a eficiência ECT na degradação do composto, sua eficiência de remoção foi de 45% em três dias, enquanto a segunda maior eficiência remoção foi obtida por EC-100 com 31%, 13% a mais de eficiência para ECT-100, além disso obteve menor valor residual do composto com 66 mg/L e 68mg/L.h⁻¹ de velocidade de remoção, perdendo apenas para PSD-100 que obteve 78 mg/L.h⁻¹.

Na concentração de 150 mg/L de Benzeno, *Escherichia coli* transformada (ECT-150), pode-se ver que foi obtido valor de eficiência de remoção em 3 dias de 23% a 32% maior que as outras cepas testadas, além disso no período de 10 dias sua eficiência de remoção também foi cerca de 7% a 12% maior as outras e sua velocidade de remoção foi de 26% mais rápido contra PSD-150 e 560% mais rápido que EC-150.

Não foram encontrados estudos com inserção de plasmídeos em *Escherichia coli* para realizar degradação de BTEX, entretanto trabalho de Zylstra, Gibson, (1989), realizam o estudo do gene todC1C2 pertencente a *Pseudomonas putida* e realizam a transformação e expressão em *Escherichia coli* utilizando plasmídeos, outros trabalhos também mostram a utilização de plasmídeos para detecção de BTEX como descrito por Xu, Mulchandani, Chen, (2003) através da enzima Tolueno Dyoxigenase-Peroxidase.

Zylstra, Wackett, Gibson, (1989), utilizaram o gene *todC1C2BA* para expressar a enzima tolueno dioxygenase, a mesma expressa no presente estudo, com intuito de tornar *E. coli* capaz de degradar tricloroetileno.

Ricoy *et al.*, (2012), descreve o isolamento de novas cepas de bactérias provenientes de solo contaminado com petróleo bruto, no qual os plasmídeos das bactérias autóctones foram transformados em *Escherichia coli*, aumentando sua capacidade de degradar combustível diesel.

Tabela 10. Reatores biológicos com Benzeno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A_1 = velocidade de remoção do composto.

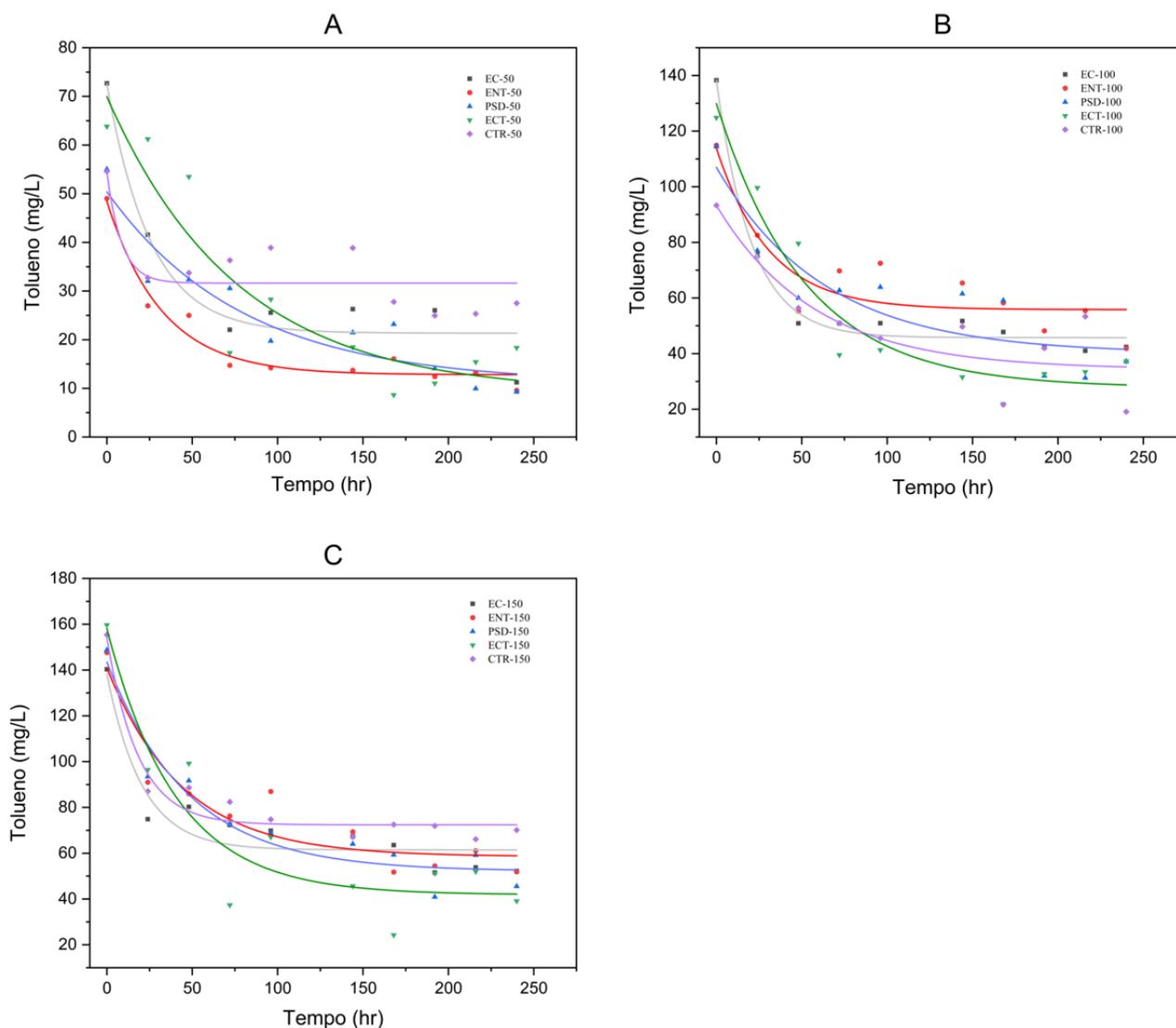
Reatores biológicos – Benzeno (50mg/L, 100m mg/L, 150 mg/L)	Eficiência de Remoção (%)		y_0 (mg/L)	A_1 (mg/L.h ⁻¹)
	3 (dias)	10 (dias)		
EC-50	52%	74%	37	40
ENT-50	34%	60%	14	34
PSD-50	22%	63%	12	46
ECT-50	46%	34%	28	46
EC-100	31%	40%	89	49
ENT-100	8%	38%	110	21
PSD-100	17%	32%	78	78
ECT-100	45%	34%	66	68
EC-150	10%	31%	100	10
ENT-150	14%	34%	78	41
PSD-150	19%	36%	92	52
ECT-150	42%	43%	93	66
CTR-50	0%	23%	25	25
CTR-100	3%	11%	86	16
CTR-150	12%	18%	119	35

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

5.5.2 TOLUENO NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 MG/L, 100 MG/L E 150 MG/L

Para o Tolueno, a cinética de degradação das cepas testadas foi parecida com a do Benzeno, na qual em menores concentrações a cinética de degradação é parecida entre as cepas, na qual a mesma ocorre de forma mais rápida, geralmente nas primeiras 100 horas, com o aumento da concentração a degradação tende a ocorrer de forma mais lenta na maioria das cepas, é possível observar através da **Figura 26**.

Figura 26. Degradação do Tolueno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Na concentração de 50 mg/L de Tolueno ECT-50, ENT-50 e EC-50, obtiveram respectivamente os melhores valores de eficiência nos primeiros 3 dias, sendo eles 73% e 70% para ambas as últimas, PSD-50 se mostrou pelo menos 26% menos eficiente que as outras três, entretanto

no período de 10 dias PSD-50 obteve a melhor eficiência de remoção demonstrando ao menos 12% mais eficiência se comparado com ECT-50 e 19% com EC-50, **Tabela 11**.

Escherichia coli transformada com os plasmídeos contendo enzimas alvos para de gradação do Tolueno (ECT-50), obteve 9 mg/L de concentração residual do composto, sendo este menor que as outras cepas testadas, incluindo EC-50 com 21 mg/L, ECT-50 também se mostrou mais rápida na degradação do composto aromático com 60 mg/L.h⁻¹, mais rápido que EC-50 em 18% e que EC-50, ENT-50 em pelo menos 54%.

Como foi observado anteriormente com o Benzeno, com aumento da concentração de Tolueno para 100 mg/L, ECT-100 obteve maior eficiência de remoção que todas as outras cepas nos períodos de 3 dias e 10 dias, respectivamente 68% e 70%, contudo EC-100 obteve valores de eficiência próximos, ECT-100 obteve também menor valor residual de composto com 27 mg/L, sendo 32% menor que o segundo menor obtido por PSD-100 com 40 mg/L, *Escherichia coli* transformada (ECT-100) se mostrou mais rápida na remoção do composto com 102 mg/L.h⁻¹, sendo 9% mais rápida que a segunda mais rápida EC-100 e 34% mais rápida que PSD-100.

Na concentração de 150 mg/L de Tolueno, ECT-150 novamente obteve maiores valores de eficiência de remoção tanto em 3 quanto em 10 dias, no período de 3 dias foi 26% mais eficiente que a segunda com maior valor de remoção PSD-150, com 77% de remoção para ECT-150 e 51% para PSD-150, nota-se que no período de 10 dias, os valores de eficiência de remoção foram muito próximos, sendo ECT-150 com 75%, 6% mais eficiente que PSD-150 com 69% e 12% mais eficiente que EC-150 com 63%.

ECT-150 obteve menor valor residual do composto com 41 mg/L, sendo este 20% menor que PSD-150 com 52 mg/L e 33% menor que EC-150 com 61 mg/L. ECT-150 também foi mais eficiente quanto a velocidade de remoção do composto com 116 mg/L.h⁻¹, sendo pelo menos 27% mais rápida que as outras cepas testadas.

Esses dados mostram que apesar de *Escherichia coli* já possuir a capacidade de degradar o Tolueno, assim como *Enterobacter ludwigii* e *Pseudomonas aeruginosa*, a inserção do plasmídeo com os genes que expressam a enzima tolueno 1,2 dioxygenase e catecol 2,3 dioxygenase, aumentaram sua eficiência de remoção do composto e também sua velocidade de remoção, principalmente com o aumento da concentração.

Tabela 11. Reatores biológicos com Tolueno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A_1 = velocidade de remoção do composto.

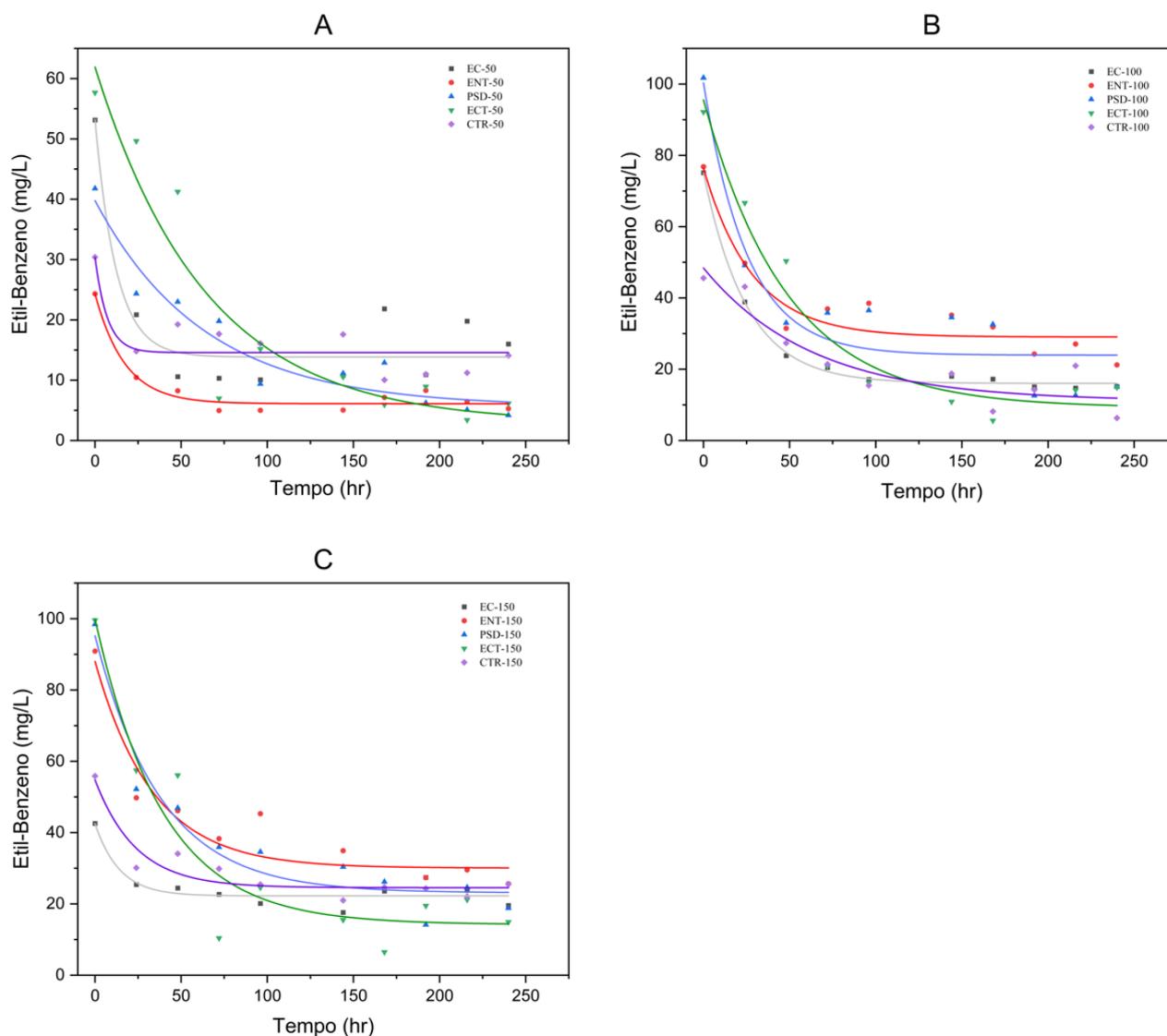
Reatores biológicos – Tolueno (50mg/L, 100m mg/L, 150 mg/L)	Eficiência de Remoção (%)		y_0 (mg/L)	A_1 (mg/L.h ⁻¹)
	3 (dias)	10 (dias)		
EC-50	70%	64%	21	51
ENT-50	70%	80%	12	35
PSD-50	44%	83%	11	39
ECT-50	73%	71%	9	60
EC-100	63%	69%	45	92
ENT-100	39%	64%	55	58
PSD-100	45%	68%	40	67
ECT-100	68%	70%	27	102
EC-150	48%	63%	61	77
ENT-150	48%	65%	58	82
PSD-150	51%	69%	52	91
ECT-150	77%	75%	41	116
CTR-50	33%	50%	31	22
CTR-100	45%	43%	34	58
CTR-150	47%	55%	72	81

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

5.5.3 ETIL-BENZENO NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 MG/L, 100 MG/L E 150 MG/L

Na **Figura 27**, é possível observar que a cinética de degradação do Etil-Benzeno foi similar ao do Benzeno e Tolueno, no qual quanto maior a concentração do composto maior a diferença na cinética de degradação entre as cepas testadas.

Figura 27. Degradação do Etil-Benzeno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

A partir dos dados da **Tabela 12**, na concentração de 50 mg/L de Etil-Benzeno, ECT-50 obteve 88% de eficiência de degradação em 3 dias e 89% em 10 dias, sendo no período de 3 dias 7% mais eficiente que EC-50 e 35% mais eficiente que PSD-50. No período de dez dias de experimento, ECT-50 obteve 89% de eficiência de remoção, apenas 1% menor que PSD-50 com 90%.

ECT-50 obteve valor de taxa residual do composto de 3 mg/L, sendo 40% menor que PSD-50 com 5 mg/L e 77% menor que EC-50 com 13 mg/L, a velocidade de remoção do composto de ECT-50 foi de 59 mg/L.h⁻¹, 42% mais rápida que PSD-50 e 34% mais rápida que EC-50.

Em concentração de 100mg/L de Etil-Benzeno, ECT-100 apresentou eficiência de degradação semelhante a EC-100, com diferença 4%, para ambos os tempos de experimento, sendo respectivamente 77%, 84% para ECT-100 e 73%, 80% para EC-100.

Comparado a PSD-100, a eficiência de ECT-100 foi 12% maior em três dias e 1% menor em 10 dias, sendo os valores de PSD-100 respectivamente 65% e 85%. ECT-100 obteve 9 mg/L de valor residual de composto, sendo esse, 61% menor que PSD-100 com 23 mg/L e 44% menor que EC-100 com 16 mg/L. A velocidade de remoção do composto de EC-100 foi de 86 mg/L.h⁻¹ também foi 13% superior à de PSD-100 com 76 mg/L.h⁻¹ e 45% superior à EC-100 com 59 mg/L.h⁻¹.

Na concentração de 150 mg/L, novamente ECT-150 obteve valores superiores a outras cepas testadas em todos os parâmetros, com 90% de eficiência de remoção em três dias e 85% em 10 dias, sendo 27% a 43% maior que as outras cepas do estudo, seu valor residual do composto também foi o menor com 14 mg/L, sendo 39% menor que PSD-150 com 23 mg/L e 36% menor que EC-150 com 22 mg/L.

Nota-se também que a velocidade de remoção do composto de ECT-150 (86 mg/L.h⁻¹) foi consideravelmente maior que as outras cepas testadas, sendo 16% maior que PSD-150 (72 mg/L.h⁻¹) e 77% maior que EC-150 (20 mg/L.h⁻¹).

É possível observar que diferente dos resultados obtidos com Benzeno e Tolueno, *Escherichia coli* transformada obteve valores relacionados a degradação do Etil-Benzeno consideravelmente maiores que as outras cepas testadas, já nas concentrações mais baixas do composto alvo (50 mg/L), enquanto no Benzeno e Tolueno, as maiores diferenças ocorreram a partir de 100 mg/L, se tornando ainda maiores quando atingida a concentração de 150 mg/L.

Tabela 12. Reatores biológicos com Etil-Benzeno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A_1 = velocidade de remoção do composto.

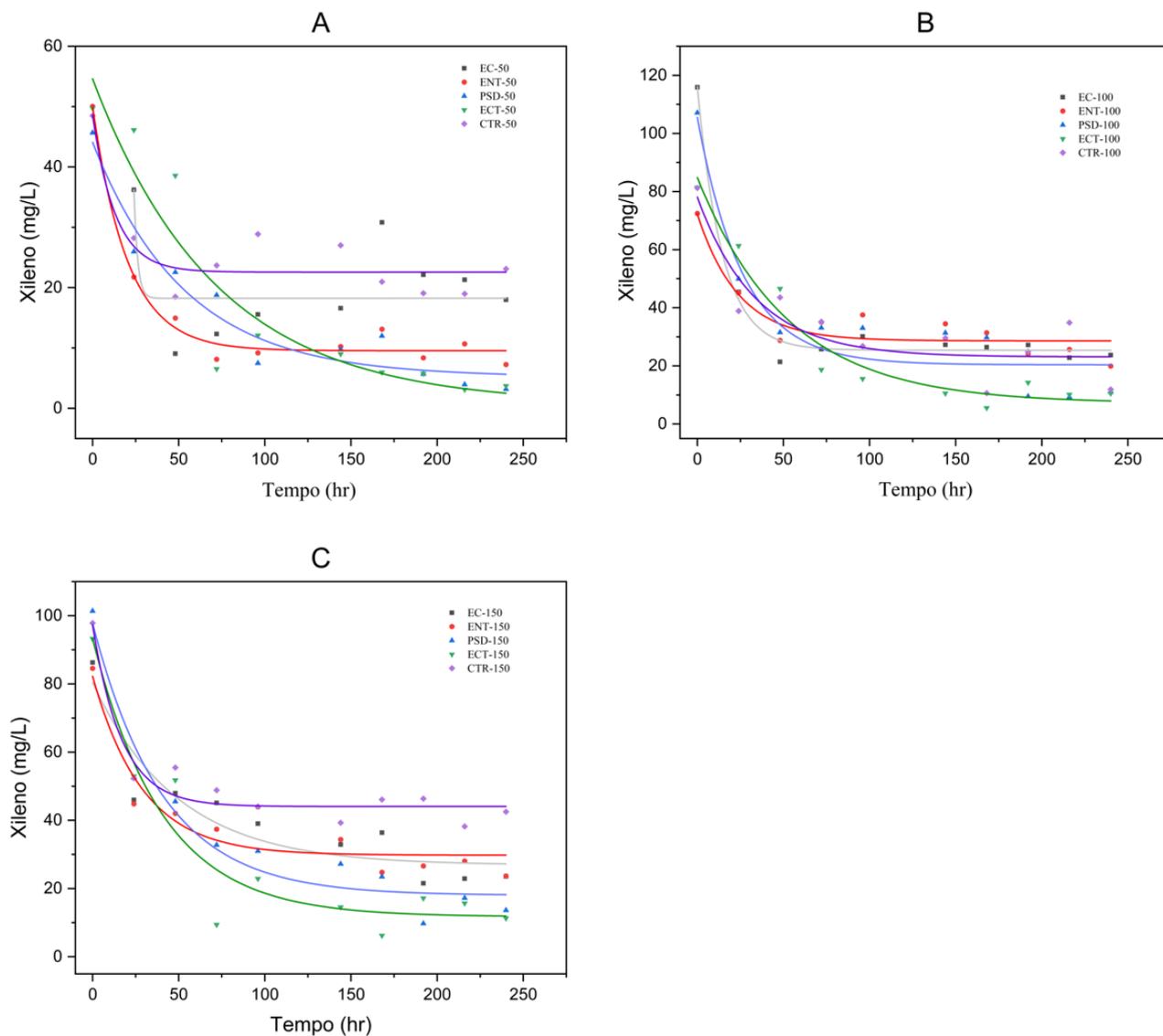
Reatores biológicos – Etil-Benzeno (50mg/L, 100m mg/L, 150 mg/L)	Eficiência de Remoção (%)		y_0 (mg/L)	A_1 (mg/L.h ⁻¹)
	3 (dias)	10 (dias)		
EC-50	81%	70%	13	39
ENT-50	80%	78%	6	18
PSD-50	53%	90%	5	34
ECT-50	88%	89%	3	59
EC-100	73%	80%	16	59
ENT-100	52%	72%	29	47
PSD-100	65%	85%	23	76
ECT-100	77%	84%	9	86
EC-150	47%	54%	22	20
ENT-150	58%	72%	30	58
PSD-150	63%	81%	23	72
ECT-150	90%	85%	14	86
CTR-50	42%	54%	14	15
CTR-100	53%	54%	11	37
CTR-150	47%	54%	24	30

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

5.5.4 XILENO NAS CONCENTRAÇÕES DE 50 MG/L, 100 MG/L E 150 MG/L

É possível observar na **Figura 28**, que a cinética de degradação do Xileno foi parecida com a do Etil-Benzeno em ambas as concentrações.

Figura 28. Degradação do Xileno nas concentrações de 50 mg/L (A), 100 mg/L (B) e 150 mg/L (C).



Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Na **Tabela 13**, nota-se que na concentração de 50 mg/L de Xileno, as quatro cepas obtiveram eficiência de degradação em 3 dias e 10 dias superiores a 80%, com exceção de PSD-50 que obteve 59% de eficiência de degradação no período de 3 dias.

As diferenças, entretanto, ocorreram nos valores residuais do composto e na velocidade de remoção, ECT-50 obteve valor residual do composto de 0,6 mg/L, 88% menor que PSD-50 com 5 mg/L, 96% menor que EC-50 com 18 mg/L e 93% menor que ENT-50 com 9 mg/L.

ECT-50 obteve valor de velocidade de remoção de 54 mg/L.h⁻¹, 350% maior que EC-50 com 12 mg/L.h⁻¹ e 42% maior que ENT-50 e PSD-50.

Os resultados de eficiência de degradação do presente estudo são semelhantes com os descrito por Mukherjee, Bordoloi, (2012), no qual *Pseudomonas aeruginosa* possui grande capacidade de degradação de Xileno, obtendo valores de eficiência de degradação de 70% a 88%.

Diferente dos outros hidrocarbonetos aromáticos analisados, a eficiência de degradação de todas as cepas testadas no período de 10 dias foi superior a 70%, indicando assim que todas são eficientes na degradação deste composto, contudo de maneira semelhante aos outros compostos ECT obteve via de regra valores de eficiência de remoção maiores que as outras cepas bacterianas, alcançando maior valor de eficiência de remoção (90%) em 3 dias, na maior concentração testada (150 mg/L).

Na concentração de 100 mg/L de Xileno, ECT-100 obteve valor residual do composto de 7 mg/L, sendo pelo menos 65% menor que todas as outras cepas, apesar disso sua velocidade de remoção 78 mg/L.h⁻¹, foi 8% menor que PSD-100 com 85 mg/L.h⁻¹ e 13% menor que EC-100.

Em 150 mg/L do composto alvo, ECT-150 obteve valor residual do composto de 12 mg/L, isto é, pelo menos 33% menor que as outras bactérias testadas e sua velocidade de remoção e velocidade de remoção dos compostos foi de 82 mg/L.h⁻¹, praticamente igual a de PSD-150 com 80 mg/L.h⁻¹, mas 57% maior que EC-150 e ENT-150.

A maior eficiência de degradação do Xileno pelas bactérias, provavelmente se deu a sua menor toxicidade quando comparado com os outros compostos que fazem parte dos BTEX, com o Benzeno que além de possuir alta toxicidade é altamente recalcitrante, sendo assim mais difícil de degradar com cepas isoladas.

O Etil-Benzeno e o Xileno foram os compostos com maior variação durante as análises em HPLC, isso provavelmente ocorre devido à baixa solubilidade de ambos, sendo de apenas 150 mg/L, enquanto o Benzeno e o Tolueno possuem respectivamente 1780 mg/L e 500 mg/L de solubilidade (Fayemiwo, 2017).

Tabela 13. Reatores biológicos com Xileno, eficiência de remoção em porcentagem para os tempos de três e dez dias, y_0 = residual do composto e A1 = velocidade de remoção do composto.

Reatores biológicos – Xileno (50mg/L, 100m mg/L, 150 mg/L)	Eficiência de Remoção (%)		y_0 (mg/L)	A1 (mg/L.h ⁻¹)
	3 (dias)	10 (dias)		
EC-50	87%	81%	18	12
ENT-50	84%	86%	9	40
PSD-50	59%	93%	5	38
ECT-50	87%	93%	0,6	54
EC-100	78%	80%	25	90
ENT-100	52%	73%	28	43
PSD-100	69%	90%	20	85
ECT-100	77%	87%	7	78
EC-150	48%	73%	26	54
ENT-150	56%	72%	29	52
PSD-150	68%	87%	18	80
ECT-150	90%	88%	12	82
CTR-50	51%	52%	22	26
CTR-100	57%	69%	23	54
CTR-150	50%	57%	44	53

Fonte: Elaborado pelo Autor (2024).

Em todas as concentrações *Enterobacter ludwigii* foi capaz de degradar BTEX, possivelmente porque são capazes de degradar compostos policromáticos como HPA, assim como mostram estudos realizados por Yousaf, (2011), agindo principalmente associada a algumas espécies vegetais, apesar disso foi constatado durante o estudo que com o aumento da concentração dos compostos a sua eficácia diminuiu tanto em crescimento quanto na degradação dos compostos.

Pseudomonas aeruginosa apresentou capacidade degradar os compostos em todas as concentrações, indo acordo com estudos realizados por Mukherjee, (2012), no qual os testes da degradação de BTEX foram realizados tanto em solo quanto em meio líquido, mostrando a capacidade de *P. aeruginosa* de degradar hidrocarbonetos aromáticos, apesar de ter eficiência menor quando comparado com consórcios microbianos, isso provavelmente se dá devido as diferentes rotas de degradação que podem ser utilizadas por diferentes espécies bacterianas para estes compostos.

Por exemplo *Pseudomonas putida* é comumente apontada na literatura, como bactéria modelo na degradação tanto de BTEX quanto de HPA, estudo realizado por Chicca, (2020), isolou uma

nova cepa por capaz de remover em média 40% da concentração inicial dos BTEX em apenas 36 horas.

Essa espécie também foi utilizada como modelo do presente estudo, na qual foram selecionados dois de seus genes *todC2* (tolueno 1,2 dioxygenase) e *dmbP* (catechol 2,3 dioxygenase) semelhante ao trabalho de Chicca, (2020), no qual as enzimas utilizadas pela *Pseudomonas putida* para degradação dos compostos aromáticos foram as dioxygenases, além da enzima responsável pela degradação do tolueno também foi identificada a enzima benzeno dioxygenase, o *todC2* e o *dmbP* foram utilizados para montagem dos plasmídeos no vetor *pet28A*, estes que por sua vez se mostraram mais eficazes na degradação dos compostos que as outras espécies testadas, incluindo a *Pseudomonas aeruginosa*.

Apesar das cepas poderem apresentar patogenicidade, a maioria são por infecções oportunistas, isto é, quando o hospedeiro apresenta alguma imunodeficiência, todas possuem grande potencial biotecnológico, principalmente a *Escherichia coli* que pode ser utilizada apenas para expressar as enzimas de interesse e degradação de diversos compostos como BTEX, HPA e metais pesados.

Através da purificação dessas enzimas, elas podem ser utilizadas como biorremediadoras sem a necessidade de colocar os microrganismos no ecossistema, causando assim menos impactos ao ambiente que a utilização de produtos químicos.

6 CONCLUSÕES

Todas as espécies do estudo foram capazes de tolerar e crescer em concentrações de BTEX de 50 mg/L, 100 mg/L e 150 mg/L, apesar disso quanto maior a concentração dos hidrocarbonetos aromáticos maior é a fase de lag ou de adaptação das cepas microbianas estudadas. A *Enterobacter ludwigii*, começando a crescer no meio com 150mg/L de BTEX apenas após 150 horas demonstrando que quanto maior o estresse causado, maior o tempo necessário de adaptação.

Com os resultados foi possível concluir que as cepas recombinantes são mais eficientes na degradação do benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno, quando comparados com espécies isoladas de ambientes contaminados como a estação de tratamento de efluentes industriais (ETE-Multifábrica), essa eficiência aumenta também com o aumento da concentração dos compostos, isto é, quanto maior a concentração maior a eficiência, necessitando assim de mais estudos para conhecer os limites de degradação, bem como concentrações tóxicas e inibitórias de cada cepa microbiana.

Também foi possível observar que quanto maior a concentração maior foi a velocidade de remoção do composto por parte da *Escherichia coli* recombinante (transformada) e menor foi a concentração residual dos compostos nos reatores biológicos, é válido ressaltar que com as menores concentrações testadas (50mg/L) dos BTEX, os valores de degradação e eficiência foram muito próximos entre as espécies estudadas, não havendo aparente inibição dos processos de degradação.

Entretanto inibições metabólicas foram evidenciadas para concentrações acima de 100 mg/L, principalmente para a cepa *Enterobacter ludwigii*, a qual apresentou baixa eficiência de remoção dos compostos aromáticos, esse efeito também ocorreu com a maior parte das cepas testadas com altas concentrações de benzeno.

Não foi possível correlacionar o crescimento das cepas com a degradação dos compostos, em nenhum dos meios testados, com isso não é possível afirmar que os compostos degradados foram utilizados como fonte de carbono pelas cepas testadas.

Alguns reatores com *Escherichia coli* sem transformação, *Enterobacter ludwigii* e *Pseudomonas aeruginosa*, apresentaram formação de biofilme na parte mais inferior dos reatores biológicos mesmo sob agitação constante, segundo Bose e Ghosh (2011) a presença de biofilme geralmente indica que o ambiente na qual as cepas se encontram não está favorável para seu crescimento, neste caso a presença de biofilme pode indicar estratégia de adaptação das cepas ao ambiente desfavorável com altas concentrações de BTEX.

A metodologia de análise de BTEX em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), se mostrou eficiente, sendo capaz de identificar desde concentrações mais altas (150 mg/L) até concentrações mais baixas (5 mg/L), também se mostrou mais fácil de analisar quando comparado

à cromatografia gasosa (GC), principalmente devido a grande quantidade de amostras a serem analisadas e o método escolhido para retirada das alíquotas, que levou em consideração as dificuldades de metodologias envolvendo mensuração BTEX, principalmente devido à sua volatilização.

Mais estudos se fazem necessários principalmente para entender quais compostos intermediários podem ser gerados a partir da degradação dos BTEX, como diminuir a volatilização do composto para uma melhor análise, tendo em vista que as amostras tinham que ser retiradas até 5 minutos antes da análise para evitar perda por volatilização.

Alguns testes de volatilização foram realizados e cerca de 50% da concentração do composto da amostra é perdida após 15 minutos da retirada da alíquota.

Também é preciso entender como as espécies sem alterações genéticas induzidas conseguem suportar concentrações tão altas de BTEX (150 mg/L), sendo estas cerca de 40 a 160 vezes maior que a permitida pelo CONAMA, Resolução nº 430 de 2011, quais rotas de degradação são utilizadas por estes microrganismos ou quais enzimas são expressadas para diminuir o estresse celular oriundo da toxicidade destes compostos.

7 REFERÊNCIAS

ACER, O. *et al.* Evaluating degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) potential by indigenous bacteria isolated from highly contaminated riverbank sediments. **Environmental Earth Sciences**, v. 80, p. 773, 2021.

AISLABIE, J.; SAUL, D. J.; FOGHT, J. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, p. 171–179, 2006. doi:10.1007/s00792-005-0498-4.

ALSALKA, Y.; KARABET, F.; HASHEM, S. Development and optimisation of quantitative analytical method to determine BTEX in environmental water samples using HPLC-DAD. **Analytical Methods**, v. 2, n. 8, p. 1026-1035, 2010.

AL-ZUHAIRY, M. S.; AL-ABOODI, A. H.; MOHAMMED, R. A. Mono-and Multi-Langmuir Sorption Isotherm Models of BTEX Removal from Groundwater by GDA. **International Journal of Civil Engineering and Technology**. v. 9, n. 8, p. 226-238, ago. 2018.

ANDERSON, M. A. Removal of MTBE and other organic contaminants from water by sorption to high silica zeolites. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 725–727, 2000.

ATLAS, R. M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 35, p. 317–327, 1995.

BABAEV, E. R. *et al.* Transformation of heavy Balakhani oil hydrocarbons in the course of oil biodegradation in soil. **Solid Fuel Chemistry**, v. 53, p. 90–95, 2019. doi:10.3103/S0361521919020022.

BACCARO, M. R. *et al.* Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 15-18, 2002.

BAHRAMI, M.; PIRMOHAMMADI, Z.; BAHRAMI, A. A review of new adsorbents for separation of BTEX biomarkers. **Biomedical Chromatography**, 2021. doi:10.1002/bmc.5131.

BARANYI, J.; PIN, C. Estimating Bacterial Growth Parameters by Means of Detection Times. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 732-736, fev. 1999. Instituto de Pesquisa de Alimentos, Laboratório de Reading, Reading, Reino Unido, 1998. Disponível em: 0099-2240/99/\$04.0010.

BARTILSON, M.; SHINGLER, V. Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenol-catabolizing *Pseudomonas* CF600. **Gene**, v. 85, n. 2, p. 233-238, 1989.

BERTHE, T. *et al.* Evidence for coexistence of distinct *Escherichia coli* populations in various aquatic environments and their survival in estuary water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 15, p. 4684–4693, 2013.

BLUMER, M.; BLUMER, W.; REICH, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of a mountain valley: Correlation with highway traffic and cancer incidence. **Environmental Science and Technology**, v. 11, p. 1082–1084, 1997.

BLYTON, M. D. J.; GORDON, D. M. Genetic attributes of *E. coli* isolates from chlorinated drinking water. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, e0169445, 2017.

BOSE, S.; GHOSH, A. K. Biofilms: A Challenge To Medical Science. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2011, vol. 5, n. 1, p. 127-130.

BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 430, de 2011. Dispõe sobre critérios básicos e diretrizes gerais para a avaliação de impacto ambiental.

BRASIL. CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 273, de 2000. Dispõe sobre a exigência que postos de combustíveis realizem análises de BTEX e HPA.

BYAPPANAHALLI, M. N. *et al.* The population structure of *Escherichia coli* isolated from subtropical and temperate soils. **Science of the Total Environment**, v. 417-418, p. 273–279, 2012.

CALDWELL, C. C. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin causes cystic fibrosis airway pathogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 175, p. 247388, 2009.

CÂMARA, I. R. Influência da microaeração intermitente na degradação anaeróbia da anilina. 2021. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2021.

CAMPOS-CANDEL, A.; LLOBAT-ESTELLÉS, M.; MAURI-ACUEJO, A. Comparative evaluation of liquid chromatography versus gas chromatography using a -cyclodextrin stationary phase for the determination of BTEX in occupational environments. **Talanta**, v. 78, n. 2, p. 1286-1292, 2009.

CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodeterioration**, v. 3, p. 351–368, 1992.

CERQUEIRA, M. B. *et al.* Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 156–159, 2011.

CHICCA, I. *et al.* Degradation of BTEX mixture by a new *Pseudomonas putida* strain: role of the quorum sensing in the modulation of the upper BTEX oxidative pathway. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 36203-36214, 2020. doi:10.1007/s11356-020-09650-y.

CHOI, Y. S.; PACK, S. P.; YOO, Y. J. Development of a plasmid display system using GAL4 DNA binding domain for the in vitro screening of functional proteins. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 1707-1711, 2005.

CLARK, J. *et al.* A Look at Transformation Efficiencies in *E. coli*: An Investigation into the Relative Efficiency of *E. coli* to Take up Plasmid DNA Treated with the Complex Molecular Trivalent Cations Spermine or Spermidine within the Context of the Hanahan Protocol for Transformation. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology** v. 2, p. 68-80, 2002.

DAVIN-REGLIA, A. *et al.* Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 2019.

DÍAZ, E. *et al.* Biodegradation of Aromatic Compounds by *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 4, p. 523-569, dez. 2001.

DOLKAR, D. *et al.* Stress tolerance and plant growth promotion potential of *Enterobacter ludwigii* PS1 isolated from Seabuckthorn rhizosphere. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 14, p. 438-443, abr. 2018.

- DOU, J. *et al.* Anaerobic BTEX biodegradation linked to nitrate and sulfate reduction. **Journal of Hazardous Materials**, v. 151, n. 2-3, p. 720–729, 2008.
- EDWARDS, K. F. *et al.* Allometric scaling and taxonomic variation in nutrient utilization traits and maximum growth rate of phytoplankton. **Limnology and Oceanography**, v. 57, n. 2, p. 554-566, 2012.
- ESCHERICH, T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1884. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 1220–1225, 1988.
- FAYEMIWO, O. M.; DARAMOLA, M. O.; MOOTHI, K. BTEX compounds in water-future trends and directions for water treatment. **Water SA**, v. 43, 2017.
- FLORES-CARRERO, A. *et al.* Nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter ludwigii* co-harboring CTX-M-8, SHV-12 and TEM-15 in a neonatal intensive care unit in Venezuela. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 7, p. 114-118, 2016.
- FREEMAN, D. J.; CATTELL, F. C. R. Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Science & Technology**, v. 24, n. 10, 1990.
- GHAFOOR, A.; HAY, I. D.; REHM, B. H. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 5238–5246, 2011.
- GILL, C. O.; GREER, G. G.; JONES, T.; BADONI, M.; DILTS, B. D. Induction of a lag phase by chiller temperatures in *Escherichia coli* growing in broth or on pork. **Food Microbiology**, v. 18, p. 141-149, 2001.
- GORDON, D. M.; COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: Host and geographic effects. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3575–3586, 2003.
- GOVENDER, K. *et al.* A novel and more efficient biosynthesis approach for human insulin production in *Escherichia coli* (*E. coli*). **AMB Express**, 2020.

- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.
- HARITASH, A. K.; KAUSHIK, C. P. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, n. 1-3, p. 1-15, 2009.
- HEIBATI, B. *et al.* BTEX exposure assessment and quantitative risk assessment among petroleum product distributors. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 445-449, 2017. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.06.055.
- HENRY, R. Etymologia: *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 8, p. 1310, 2015.
- HOFFMANN, H. *et al.* Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. **Systematic Applied Microbiology**, v. 20, p. 206-212, 2005.
- HONG, W. J. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and alkylated PAHs in the coastal seawater, surface sediment and oyster from Dalian, Northeast China. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 11-20, 2016.
- HORMAECHE, E.; EDWARDS, P. R. A proposed genus *Enterobacter*. **International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy**, v. 10, p. 71-74, 1960.
- HUANG, W. H.; KAO, C. M. Bioremediation of Petroleum-Hydrocarbon Contaminated Groundwater under Sulfate-Reducing Conditions: Effectiveness and Mechanism Study. **Journal of Environmental Engineering**, 2015.
- HUANG, Y.; LI, L. Biodegradation Characteristics of Naphthalene and Benzene, Toluene, Ethyl Benzene, and Xylene (BTEX) by Bacteria Enriched from Activated Sludge. **Water Environment Research**, v. 86, n. 3, 2014.
- ISHII, S. *et al.* Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 612-621, 2006.

- ISHII, S. *et al.* Factors controlling long-term survival and growth of naturalized *Escherichia coli* populations in temperate field soils. **Microbes and Environments**, v. 25, n. 1, p. 8–14, 2010.
- JACOBY, G. *et al.* Transposition of *Pseudomonas* toluene-degrading genes and expression in *Escherichia coli*. **Nature**, v. 274, p. 179-180, 1978.
- JANG, J. *et al.* Dynamic changes in the population structure of *Escherichia coli* in the Yeongsan River basin of South Korea. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 91, n. 11, p. 127, 2015.
- JANG, J. *et al.* Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications---a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, p. 570–581, 2017.
- JINDROVÁ, E. *et al.* Bacterial Aerobic Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene. **Folia Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 83-93, 2002.
- JUNIOR, P. Q. B. *et al.* Eletroforese bidimensional e espectrometria de massa como ferramentas proteômicas aplicadas à definição de marcadores proteicos associados à eficiência reprodutiva de caprinos. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 100-112, 2013.
- KIM, M. N. *et al.* Construction and comparison of *Escherichia coli* whole-cell biosensors capable of detecting aromatic compounds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 60, p. 235-245, 2005.
- KITA, A. *et al.* Isolation of thermophilic acetogens and transformation of them with the *pyrF* and *kanR* genes. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 77, n. 2, p. 301-306, 2013.
- KUPPUSAMY, S. *et al.* Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by novel bacterial consortia tolerant to diverse physical settings - Assessments in liquid- and slurry-phase systems. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 108, p. 149–157, 2016.
- LAWAL, A. T. Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review. **Cogent Environmental Science**, 2017. doi:10.1080/23311843.2017.1339841.
- LAWRENCE, J. G.; OCHMAN, H. Reconciling the many faces of lateral gene transfer. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1–4, 2002.

LI, Yueh-Fen *et al.* Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. **Environmental Pollution**, v. 152, p. 123-129, 2008.

LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 369-81.

LIN, C. W.; CHENG, Y. W.; TSAI, S. L. Multi-substrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1211–1217, 2007. doi:10.1016/j.procbio.2007.05.020.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 634-40, 2002.

LOW, S. X. Z. *et al.* Viability of *Escherichia coli* ATCC 8739 in Nutrient Broth, Luria-Bertani Broth and Brain Heart Infusion over 11 Weeks. **Electronic Physician**, v. 5, n. 1, p. 576-581, 2013.

MAGDY, M. M. *et al.* Different metabolic pathways involved in anthracene biodegradation by *Brevibacillus*, *Pseudomonas* and *Methylocystis* Species. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 11, n. 4, 2022.

MAHJOUBI, M. *et al.* Microbial bioremediation of petroleum hydrocarbon–contaminated marine environments. **Recent Insights in Petroleum Science and Engineering**, 2018. doi:10.5772/intechopen.72207.

MELLO, J. M. *et al.* Biodegradation of BTEX compounds from petrochemical wastewater: Kinetic and toxicity. **Journal of Water Process Engineering**, v. 32, p. 1009, 2019.

MOTTERAN, F. *et al.* Methanogenic potential of an anaerobic sludge in the presence of anionic and nonionic surfactants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 96, p. 198–204, 2014. doi:10.1016/j.ibiod.2014.10.001.

MOTTERAN, F. *et al.* Taxonomic Identification of Microbiota from Enrichment and Isolation of Phenanthrene-Degrading Bacteria in Aerobic Reactors. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 235, p. 341, 2024.

MOHAMMADYAN, M. *et al.* Risk assessment of benzene among gas station refueling workers. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, p. 3563-3569, 2016.

MUKHERJEE, A. K.; BORDOLOI, N. K. Biodegradation of benzene, toluene, and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 199-206, 2012.

MULABAGAL, V. *et al.* Chemical fingerprinting of petroleum biomarkers in Deepwater Horizon oil spill samples collected from Alabama shoreline. **Marine Pollution Bulletin**, v. 70, p. 147–154, 2013. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.02.026.

NAPA AVILES, L. A.; CALSINA CALIXTO, M. D. Relação entre el Ácido Cafeico y los antibióticos Ciprofloxacino y Kanamicina sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Tese (Licenciado em Nutrição e Dietética) - Universidade Peruana de Ciências Aplicadas, Faculdade de Ciências da Saúde, Lima, 2021. Orientadores: Milón Mayer Pohl Luis, Katherin Lizet Peñaranda Manrique.

NEFF, J. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. **Elsevier Science**, 1980.

PAAUW, A. *et al.* Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. **PLoS ONE**, v. 3, p. 3018–3028, 2008.

PACHECO, C. *et al.* Pesquisa translacional na era pós-genômica: avanços na área da transcriptômica. **Saúde em Debate**, v. 43, p. 169-180, 2019.

PAUROBLOT, C. *et al.* Structural features and bioremediation activity of an exopolysaccharide produced by a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated in the Chernobyl exclusion zone. **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 154-162, 2013.

PIRES, E. J. V. C. *et al.* Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de hospital universitário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 21, n. 4, p. 384-390, 2009.

RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; GRIEKEN, R. V. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. **Atmospheric Environment**, v. 42, p. 2895–921, 2008.

REYES, C. Y. *et al.* Weathering of petroleum biomarkers: review in tropical marine environment impacts. **OALib**, v. 01, p. 1–13, 2014. doi:10.4236/oalib.1101004.

RICO, C. *et al.* Transferencia de la capacidad degradadora de combustible diesel a *Escherichia coli* DH5 α por plásmidos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. **Interciencia**, v. 37, n. 9, p. 645-650, 2012.

ROCHA, T. L. *et al.* Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. Brasília, DF: Embrapa, 2005.

ROCHELLE-NEWALL, E. *et al.* A short review of fecal indicator bacteria in tropical aquatic ecosystems: knowledge gaps and future directions. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 308, 2015.

RUMCHEV, K.; BROWN, H.; SPICKETT, J. Volatile organic compounds: do they present a risk to our health? **Reviews on Environmental Health**, v. 22, n. 1, p. 39–55, 2007.

SAFDARI, M. S. *et al.* Study Potential of Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in Bioremediation of Diesel-Contaminated Water. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, p. 37, 2017.

SALMIEN, J. M. *et al.* Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. **Biodegradation**, v. 15, p. 29–39, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. **New York: Cold Spring Harbor Press**, 2001.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani **Broth**. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8746-8749, dez. 2007.

SHEN, L. *et al.* Sources profiles of volatile organic compounds (VOCs) measured in a typical industrial process in Wuhan, Central China. **Atmosphere**, v. 9, n. 8, p. 297, 2018.

- SHOEBITZ, M. *et al.* Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1768-1774, 2009.
- SICARD, J. F. *et al.* Interactions of intestinal bacteria with components of the intestinal mucus. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 387, 2017.
- SINGH, N. K. *et al.* Multi-drug resistant *Enterobacter bugandensis* species isolated from the International Space Station and comparative genomic analyses with human pathogenic strains. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 175, 2018.
- STRECK, E. V. *et al.* Solos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRGS, 2002. 130 p.
- SMITH, R. L. Princípios da Análise Matemática. **Nova York: Academic Press**, 2019.
- SUYAMA, A. *et al.* Engineering Hybrid *Pseudomonads* Capable of Utilizing a Wide Range of Aromatic Hydrocarbons and of Efficient Degradation of Trichloroethylene. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 14, p. 4039-4046, 1996.
- TAKAI, K.; HISAMATSU, K. SfinX: a method for assembly of protein coding sequences with high success rates. **Biotechnology Letters**, 2016.
- TANG, Y. J.; MEADOWS, A. L.; KEASLING, J. D. A kinetic model describing *Shewanella oneidensis* MR-1 growth, substrate consumption, and product secretion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 125-133, 2007.
- TENAILLON, O. *et al.* The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.
- THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 22, p. 8671, 2020. doi:10.3390/ijms21228671.
- VARJANI, S. J. *et al.* Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from onshore sites of Gujarat, India. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 103, p. 116–124, 2015. doi:10.1016/j.ibiod.2015.03.030.
- WU, W.; JIN, Y.; BAI, F.; JIN, S. *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Medical Microbiology**, p. 753–767, 2015. doi:10.1016/b978-0-12-397169-2.00041-x.

WYSOCKI, R.; TAMÁS, M. How *Saccharomyces cerevisiae* copes with toxic metals and metalloids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, p. 925–951, 2010.

XIAO, Y. *et al.* Strengthening bioremediation potential: *Enterobacter ludwigii* ES2 for combined nicosulfuron and Cd contamination through whole genome and microbial diversity community analysis. **Journal of Hazardous Materials**, 2024.

XU, Z.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Detection of Benzene, Toluene, Ethyl Benzene, and Xylenes (BTEX) Using Toluene Dioxygenase-Peroxidase Coupling Reactions. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1812-1815, 2003.

YOUSAF, S. *et al.* Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2675–2683, 2011.

YU, D.; BANTING, G.; NEUMANN, N. F. A review of the taxonomy, genetics, and biology of the genus *Escherichia* and the type species *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 553–571, 2021.

YUNIATI, M. D. Bioremediation of petroleum-contaminated soil: a review. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 118, p. 012063, 2018.

ZHI, H.; ZHAO, Z.; ZHANG, L. The fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides (OCPs) in water from Poyang Lake, the largest freshwater lake in China. **Chemosphere**, v. 119, p. 1134–1140, 2015.

ZWIETERING, M. *et al.* Modeling of the bacterial growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 1875–1881, 1990.

ZYLSTRA, G. J.; GIBSON, D. T. Toluene Degradation by *Pseudomonas putida* F1: Nucleotide Sequence of the todC1C2BADE Genes and Their Expression in *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 25, p. 14940-14946, set. 1989.

ZYLSTRA, G. J.; WACKETT, L. P.; GIBSON, D. T. Trichloroethylene Degradation by *Escherichia coli* Containing the Cloned *Pseudomonas putida* Fl Toluene Dioxygenase Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 12, p. 3162-3166, dez. 1989.