

## **INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE BORRAS BIOLÓGICAS NAS MISTURAS DE DIESEL E BIODIESEL**

### **INTRODUÇÃO:**

Nas últimas décadas, as mudanças climáticas que evidenciam o efeito estufa, com emissões de gases poluentes, além dos impactos ambientais e à saúde humana, levaram a uma preocupação com os combustíveis fosseis em especial ao diesel e direcionaram a produção de combustíveis de motores ciclo diesel para o desenvolvimento de alternativas que gerem menos emissões, como os biocombustíveis a partir de recursos renováveis. Dentre as matrizes mais utilizadas, a biodiesel base metílica é amplamente mais utilizado devido ao binômio custo x produtividade.

O biodiesel consiste em ésteres mono alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa e são derivados de óleos vegetais e/ou gorduras animais. Sabe-se que o biodiesel é um éster oriundo de uma oleaginosa e do álcool metílico com catálise alcalina, cujo processo produtivo resulta um subproduto que é a glicerina bruta.

O éster metílico passa por processos de purificação para eliminar possíveis contaminantes como catalisador, álcool e glicerina, seja por lavagem, centrifugação, precipitação e/ ou destilação, mas que, mesmo assim, acaba tendo alguma situação em conjunto com possíveis elementos contaminantes como enxofre, metais como aço carbônico e umidade residual não só no diesel, mas principalmente nos tanques de armazenamentos como também nos reservatórios e até na combustão dos motores, iniciando ao longo do tempo uma reação bio-polimérica, gerando resina, goma e, borras, que impactam o bom funcionamento da combustão como também dos motores, criando

prejuízos elevados com manutenção e tempo, aos proprietários dos veículos, máquinas e equipamentos.

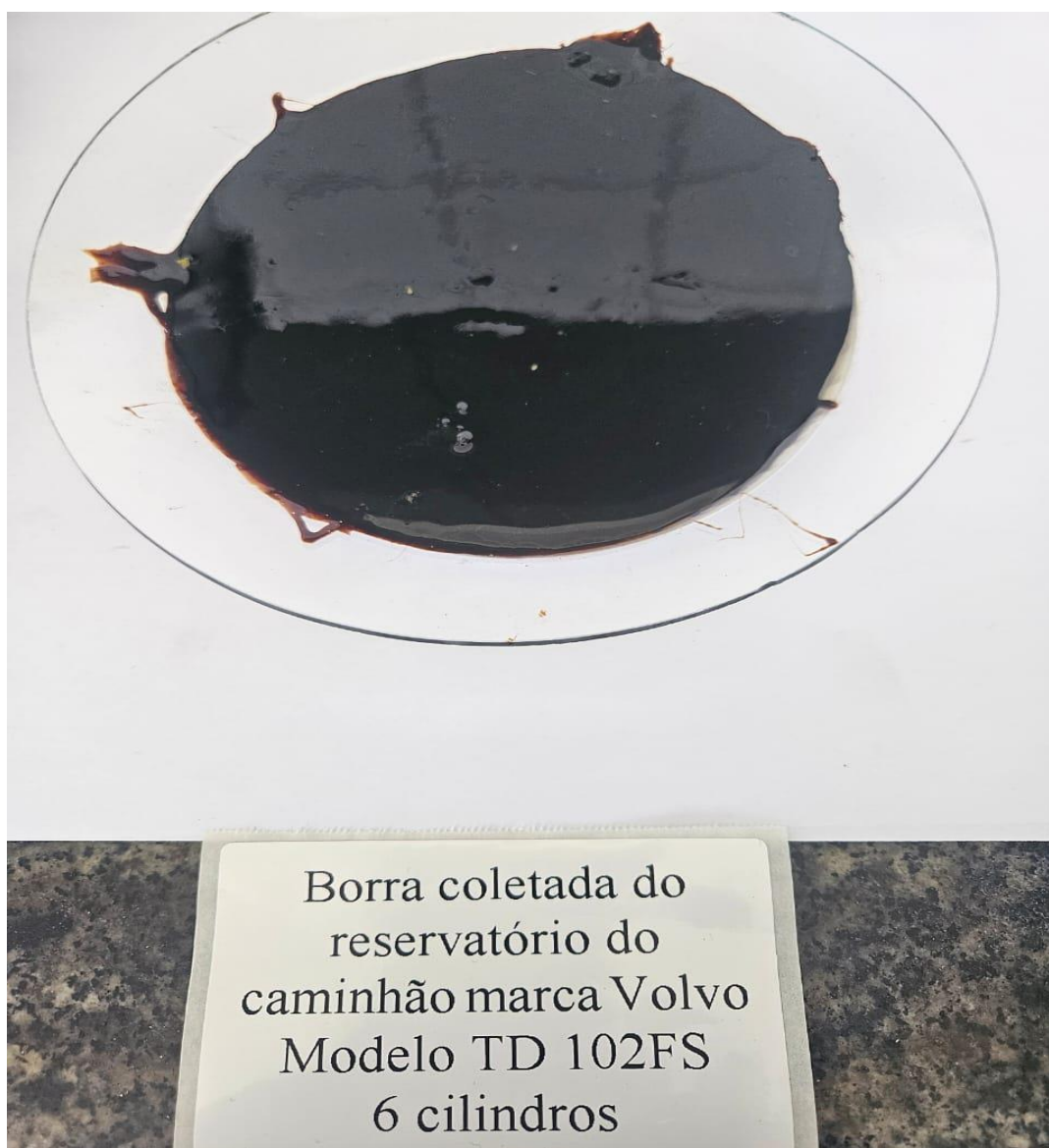
O Brasil em 2005 passou dar ênfase na alternativa de matriz energética ciclo diesel e em 2010, a adição de 5% já apresentava problemas em todo país, na formação de borras.

Com o aumento gradual do percentual de biodiesel no diesel, chegando aos dias de hoje a 14% e, 15% para março de 2025. Os problemas, consequentemente aumentaram quase que proporcionalmente, levando os fabricantes de veículos, máquinas e equipamentos a diesel a questionarem sobre possíveis soluções.

A Laboratórios Universal, indústria de especialidades químicas com quase 50 anos de atividades, acompanhando as necessidades do mercado, buscou através de seus pesquisadores em parcerias com as melhores Universidades\* e Centros de Pesquisas\*\* e nesse caso em especial, o Instituto Senai de Inovação e Biotecnologia\*\*, na busca de uma solução que amenizasse ou inibisse os problemas decorrentes. Coletou-se amostras dos tanques de armazenamento da Distribuidora de Combustíveis da Vibra Energia (foto \*) em São José dos Campos-SP, bem como do reservatório do veículo caminhão marca Volvo, modelo TD 102FS de seis (6) cilindros **(Figuras 1 e 2)**.



**Figura 1:**  
Amostras de diesel B-14



**Figura 2**

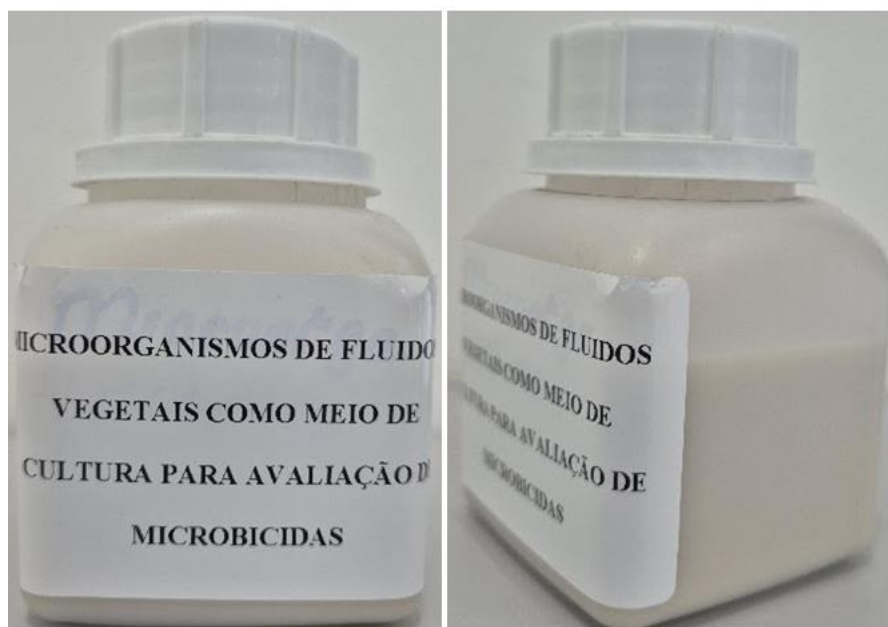
Foram desenvolvidos vários compostos e criteriosamente avaliados, sendo selecionado um composto, BX-15 que foi o melhor dos que inibem a polimerização biológica e as reações oxidativas e, realizado a avaliação microbica para o diesel em mistura de até 15% em misturas de diesel.

O composto BX-15 é uma molécula produzida pela síntese orgânica de esterificação/eterificação do ácido p-hidroxibenzoico.

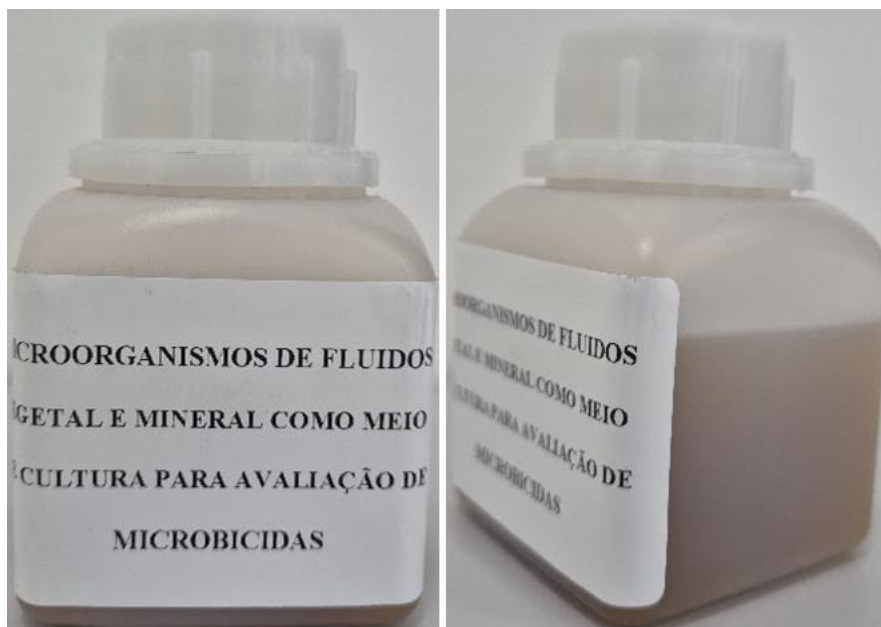
As amostras foram recebidas, armazenadas e identificadas, **Figura 3, 4, 5**, para posteriores avaliações.



**Figura 3:** Amostra de Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros, laboratório Universal identificada como Graxa Preta.



**Figura 4:** Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco do laboratório Universal, identificada como amostra branca.



**Figura 5:** Amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado do laboratório Universal, identificada como amostra dourada.

## **MEDOTOLOGIA:**

### **Avaliação mínima inibitória:**

Foi realizado o mapeamento populacional dos principais microrganismos existentes e avaliando os mais populosos foram selecionados três microrganismos:

- a) Escherichia coli 25922
- b) Pseudomonas aeruginosa AT27853
- c) Bacillus megaterium

Além de ser avaliados os microrganismos presentes nas amostras:

- d) Amostra de Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros.
- e) Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco.
- f) Amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado.

### **Metodologia de Pre-inoculação**

O pré-inóculo (5%) foi realizado a partir de linhagens estudadas de Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, e Bacillus megaterium que foram descongeladas e inoculadas 250uL em 5mL de meio LB. A incubação foi realizada overnight a 37°C e 250rpm.

Para as amostras d, e, f, foram avaliadas preparando uma suspensão de 100 ul proveniente de lodo coletado da empresa Abatedouro Aves Ideal – FRIGORÍFICO, adicionando-se caldo Caldo Bushnell Haas junto com 1% de extrato de levedura (BH+EL) e deixado em crescimento durante 15 dias a 37°C / 150 rpm; este processo foi repetido 4 vezes; o ultimo repique de cada amostra foi inoculado em Caldo Nutriente.

### **Suspensões de células bacterianas**

As suspensões das células bacterianas foram preparadas a partir do pré-inóculo, adicionando-se solução salina (PBS 1X p.H. 7,2), até atingir D.O de 0,6, que corresponde a  $1 \times 10^8$  UFC/mL (escala de MCFarland). Em seguida, foi realizada uma diluição 1:100 para chegar na densidade de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, a qual é realizada os ensaios.

### **Determinação da concentração inibitória mínima foi realizada em placa de 24 poços.**

Alíquotas do composto BIOTREAT BX-15 UNIS, **Figura 6**, foram testadas diferentes concentrações para isso o composto BIOTREAT BX-15 UNIS foi diluído em diluições seriadas de base 2 em solvente Dimetilsulfóxido (DMSO) começando com o stock de 16% e um teste sem diluições (diretamente) começando com o stock em 100%, a fim de obter uma série de concentrações, conforme demonstrado na Tabela 1. Foram adicionados 1500 µL de solução ao primeiro poço, e realizada a diluição para o próximo poço sucessivamente. O controle positivo foi feito com DMSO a 20%, e o controle negativo com DMSO a 0,1%. O volume final em cada poço foi de 1500 µL, contendo o Caldo Nutriente, o inóculo microbiano, o composto a ser avaliado ou DMSO a 20% ou DMSO a 0,1%.

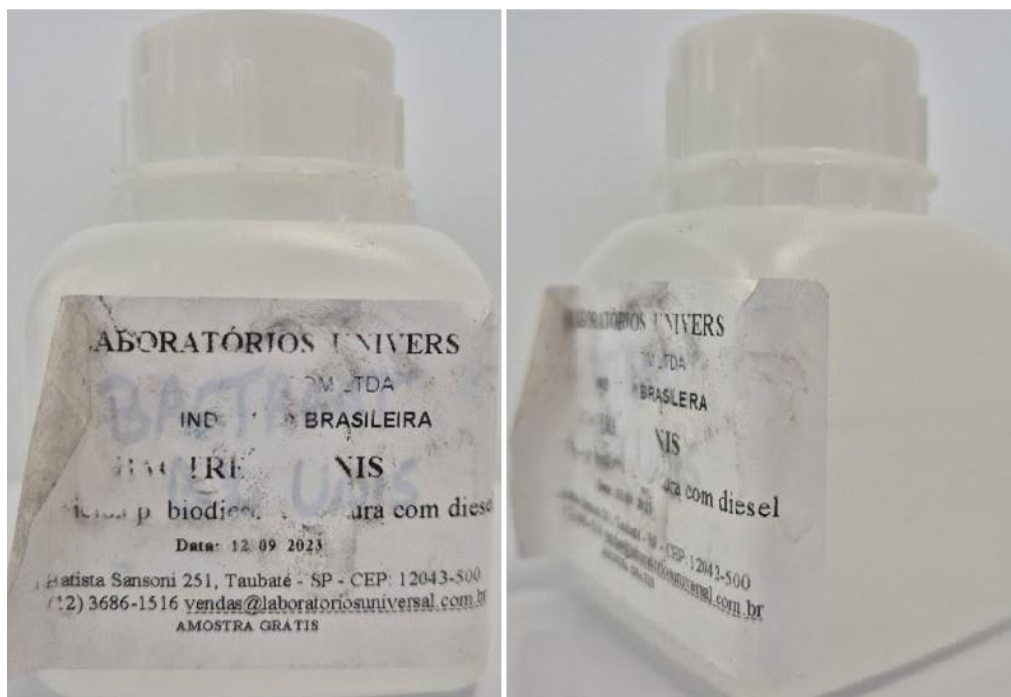


**Tabela 1:** diluições avaliadas em diferentes concentrações do composto BIOTREAT BX-15 UNIS.

| BIOTREAT BX-15 UNIS<br>Stock 100% |                  | BIOTREAT BX-15 UNIS Stock<br>16% |                  |
|-----------------------------------|------------------|----------------------------------|------------------|
| Diluição                          | Concentração (%) | Diluição                         | Concentração (%) |
| 0                                 | 50               | 0                                | 8                |
| 2                                 | 25               | 2                                | 4                |
| 4                                 | 12,5             | 4                                | 2                |
| 8                                 | 6,25             | 8                                | 1                |
| 16                                | 3,12             | 16                               | 0,5              |
| 32                                | 1,56             | 32                               | 0,25             |
| 64                                | 0,78             | 64                               | 0,125            |
| 128                               | 0,39             | 128                              | 0,062            |
| 256                               | -                | 256                              | 0,031            |
| 512                               | -                | 512                              | 0,015            |
| 1024                              | -                | 1024                             | 0,0075           |
| 2048                              | -                | 2048                             | 0,0037           |

A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) nas amostras d, e, f; foi realizada em placas de 24 poços, em triplicata, aplicando-se alíquotas da solução estoque da amostra: Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros, microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco, microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado em meio de cultivo, juntamente com a suspensão bacteriana. Inicialmente, foram adicionados 750 µL de Caldo Nutriente nos poços, seguidos de 750 µL do crescimento microbiano de cada

uma das amostras, em quantidade suficiente para obter a concentração final de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.



**Figura 6:** Composto BIOTREAT BX-15 UNIS Laboratório Universal

A placa foi incubada em estufa a 37°C por 24 horas, a 150 rpm. Após esse período, foram adicionados 30 µL de resazurina (1%) em cada poço. A placa foi então fechada, levemente homogeneizada e levada de volta à estufa, nas mesmas condições (37°C e 150 rpm), por 20 minutos. Após esse período, avaliou-se a mudança de cor da resazurina nos poços e confirmou-se o crescimento do inóculo utilizando 100 µL do conteúdo de cada poço, que foram semeados em placas de ágar nutriente e incubados a 37°C por 24 horas.

#### **Avaliações físico-químicas:**

- A) Aspecto / Aparência a 25°C
- B) Densidade 20/4°C
- C) Viscosidade cSt a 40°C.
- D) Ponto de Fulgor, °C

- E) Índice de Acidez
- F) Solubilidade

### **Ensaio Oxidativo e de Corrosividade**

- A) Estabilidade a oxidação – Metodo Racimat
- B) Corrosividade em lâmina de cobre
- C) Corrosividade – DIN 51360

### **Extração de DNA e sequenciamento**

As amostras recebidas foram usadas para extração de DNA. As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm durante 15 minutos, Tabela 2. O pellet foi utilizado para a extração de DNA. O protocolo de extração de DNA foi seguido, adicionando-se 800 µL da solução CD1 e as beads do DNeasy PowerSoil Pro Kit nos tubos junto com o pellet antes concentrado, os quais foram levados ao vortex durante 10 minutos, seguido de centrifugação a 15000 g durante um minuto. Um volume de 600-800 µL do sobrenadante foi utilizado para extração de DNA usando DNeasy PowerSoil Pro Kit. Foi adicionado 200 µl da Solução CD2, vórtexado por 5 segundos e centrifugado novamente a 15.000 x g por 1 minuto. Cuidadosamente, se transferiu até 700 µl do sobrenadante para um novo tubo microcentrífugo de 2 ml, evitando o pellet. Acrescentou-se 600 µl da Solução CD3 e misturado por 5 segundos com vórtex. Foi aplicado 650 µl do lisado em uma coluna MB Spin e centrifugado a 15.000 x g por 1 minuto, descartando o fluxo residual. Aste passo foi repetido para garantir que todo o lisado passasse pela coluna. Se utilizou a coluna MB Spin e foi inserido em um tubo de coleta limpo de 2 ml, 500 µl da Solução EA foi adicionado e centrifugado a 15.000 x g por 1 minuto. Após descartar o fluxo residual, se retornou a coluna ao mesmo tubo de coleta e adicionando 500 µl da Solução C5, se centrifugou novamente a 15.000 x g por 1 minuto. Depois de descartar o fluxo residual, a coluna MB Spin se posiciou em um novo tubo de coleta de 2 11

ml e foi centrifugado a até 16.000 x g por 2 minutos. Em seguida, se transferiu a coluna MB Spin para um tubo de eluição limpo de 1,5 ml e foi adicionado de 50 a 100 µl da Solução C6 no centro da membrana do filtro branco. O protocolo foi finalizado centrifugando a 15.000 x g por 1 minuto, descartando a coluna MB Spin e deixando o DNA pronto para as aplicações subsequentes. A quantificação do DNA obtido foi feita usando o equipamento Qubit, e a qualidade e integridade do DNA foram avaliados usando Nanodrop e gel de agarose 1%, respectivamente. Posteriormente as amostras foram sequenciadas utilizando a tecnologia Illumina MiSeq System e NextSeq 1000, com o objetivo de realizar o sequenciamento de amplicons. A TMG forneceu 50 amostras para purificação por tamanho utilizando beads AMPure X, seguida da indexação por reação de tagmentação e preparação das bibliotecas para sequenciamento multiplexado com cobertura de 25 Mb por amostra (50.000 a 100.000 reads). Os amplicons, previamente amplificados por PCR com primers específicos para Illumina, foram indexados para identificação e receberam adaptadores para ligação à flow-cell. O sequenciamento foi realizado em um kit P1 do NextSeq 1000, sendo os dados finais fornecidos ao cliente no formato FASTQ. Duas amostras apresentaram volume reduzido (26 µL e 50 µL), o que poderia comprometer a qualidade do sequenciamento, fato previamente informado ao cliente. Os primers utilizados foram V4 - 16S rRNA (390 pb, alvo: Bacteria e Archaea), com as sequências 515FB (GTGYCAGCMGCCGCGGTAA) e 806RB (GGACTACNVGGGTWTCTAAT) (Apprill et al., 2015, Caporaso et al., 2010, Parada et al., 2016).

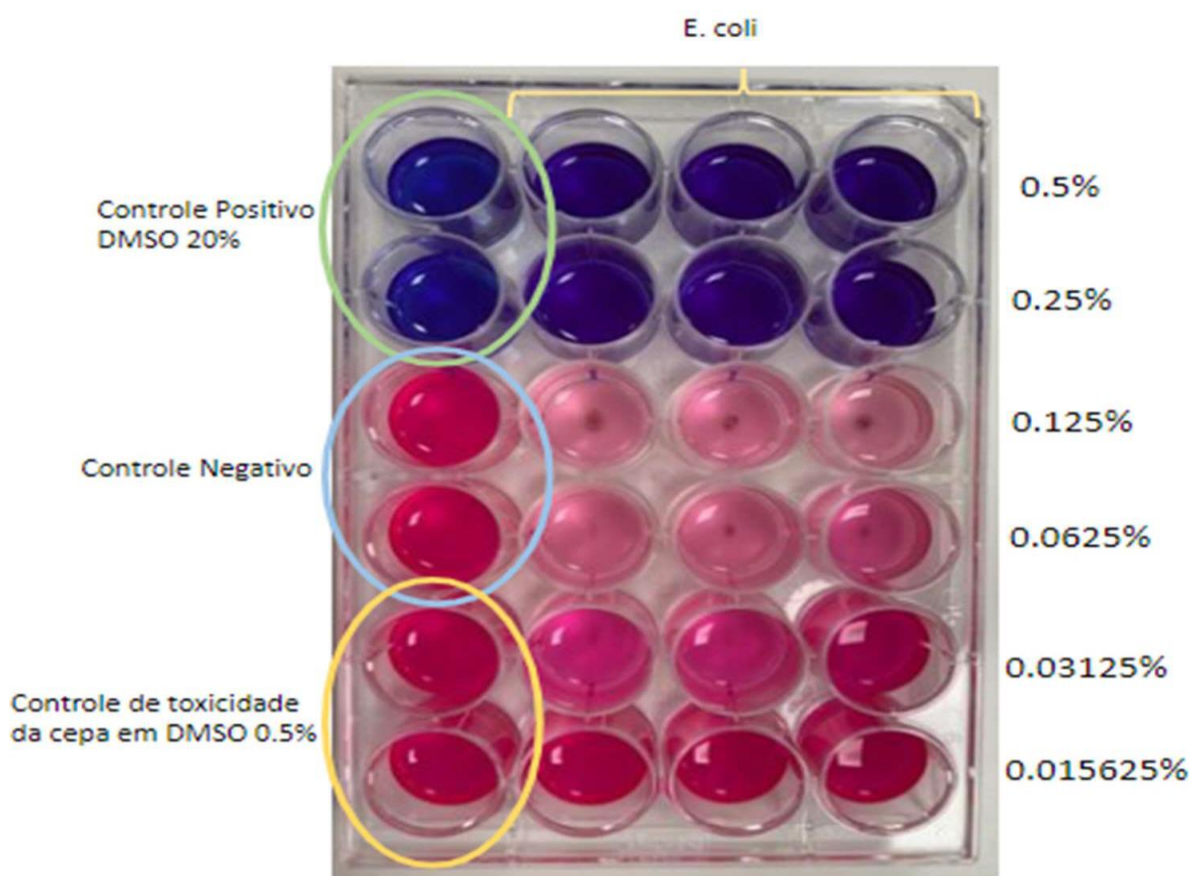
**Tabela 2:** Amostras extraídas e identificadas.

| Amostras                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Amostra 1: Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros                   |
| Amostra 2: microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco            |
| Amostra 3: microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado |
| Amostra 4: lodo coletado da empresa Abatedouro Aves Ideal – FRIGORÍFICO                                            |

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

### Avaliação da atividade microbicida MIC

**Amostras a, b, c:** A concentração inibitória mínima foi estabelecida tanto de forma qualitativa, por análise visual, quanto quantitativa, por análise de densidade optica a 600nm. Em relação a cepa Escherichia coli ATCC 25922, as amostras apresentaram atividades significativas contra O composto BX-15, testado nas concentrações de 0.5% a 0.0156%. A resazurina é uma molécula comumente utilizada como indicador redox. Possui coloração azul e uma baixa fluorescência intrínseca, porém, em resposta à atividade metabólica de células vivas, a resazurina é reduzida a resofurina, resultante da respiração aeróbica devido ao crescimento celular, que exibe uma coloração rosa e é fluorescente. Logo, foi possível observar que a partir de 0.25%, foi encontrado valores significativos de inibição bacteriana, **Figura 7**.



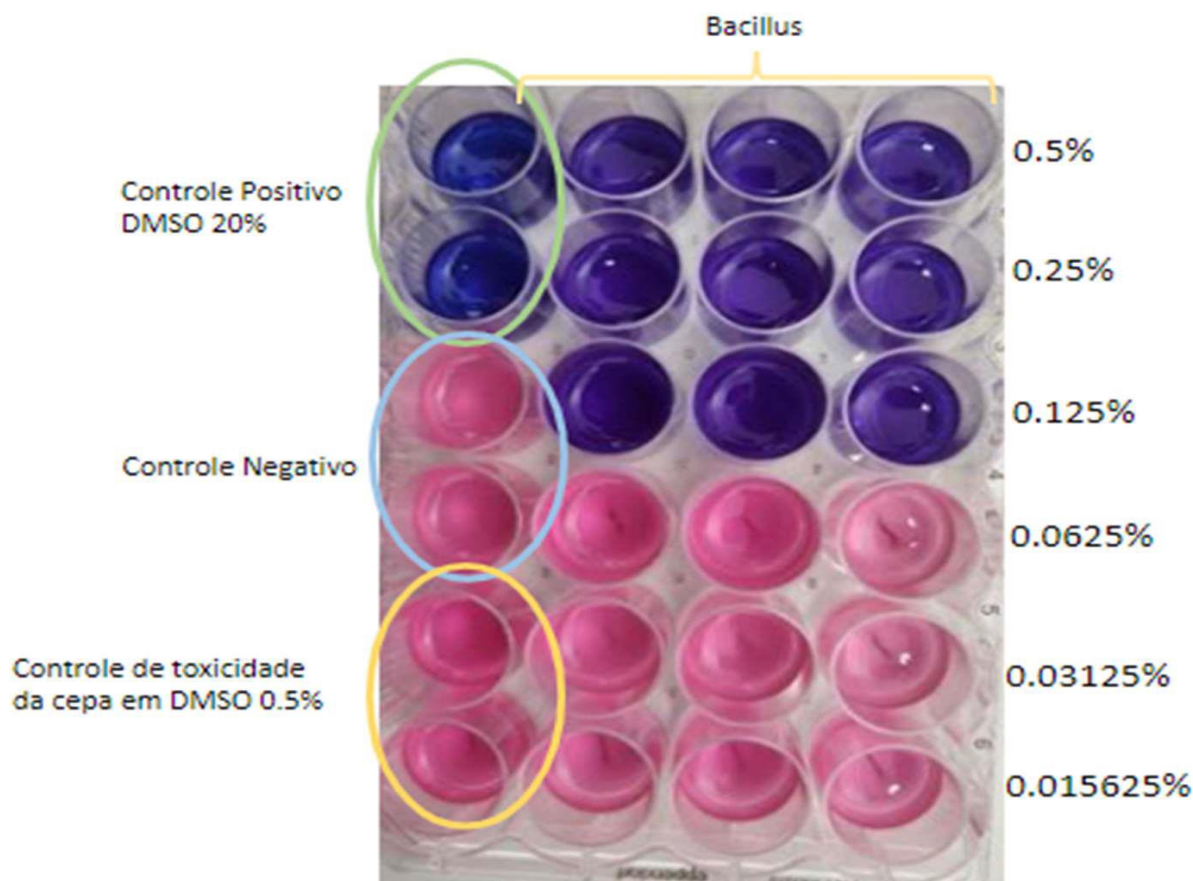
**Figura 7:** Placas de 24 poços contendo Resazurina e a cepa Escherichia coli ATCC 25922.

A mudança de cor da resazurina está associada a uma mudança na absorbância. A forma reduzida (resofurina) geralmente tem absorção máxima a 570 nm, que é a parte do espectro associada à cor rosa. O aumento na absorbância a esse comprimento de onda está correlacionado com a concentração de resofurina, refletindo na atividade metabólica da célula testada, e consequentemente na viabilidade celular. Então, quanto mais rosa, maior a ação das células vivas, o que permite a visualização gradual de diferentes tonalidades de rosa na placa. Uma análise quantitativa para determinação da concentração inibitória mínima é a medida da densidade óptica (D.O) a 600nm, que está diretamente relacionada a densidade de CFU/mL das soluções contendo as culturas testadas.



| Concentração | Densidade optica | Concentração                                       | Densidade optica |
|--------------|------------------|----------------------------------------------------|------------------|
| 0.5%         | 0.051            | Controle positivo (DMSO 20%)                       | 0.030            |
| 0.25%        | 0.048            | Controle negativo                                  | 0.92             |
| 0.125%       | 0.47             | Controle de toxicidade da cepa em 0.5% de solvente | 0.74             |
| 0.0625%      | 0.58             |                                                    |                  |
| 0.03125%     | 0.74             |                                                    |                  |
| 0.015625%    | 0.89             |                                                    |                  |

Pode-se observar que a partir da concentração de 0.125%, há um aumento significativo na densidade celular, confirmando a concentração inibitória mínima do composto em *E. coli* sendo 0.25%. O mesmo pode ser observado referente a cepa *Bacillus megaterium*, **Figura 8**:



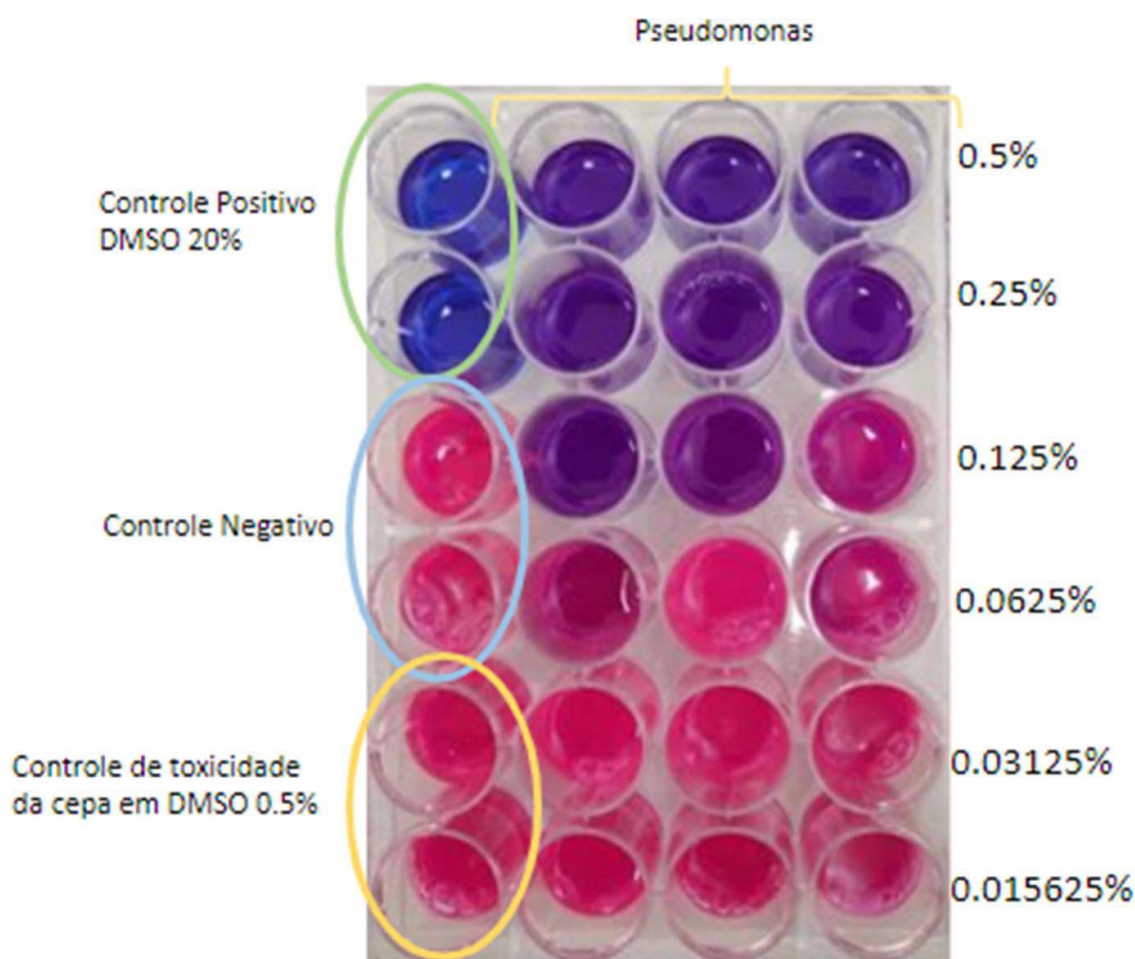
**Figura 8:** Placas de 24 poços contendo Resazurina e a cepa *Bacillus megaterium*.

Na análise visual do *Bacillus*, as amostras também apresentaram atividade contra o composto BX-15, testado nas concentrações de 0.5% a 0.0156%. Nesse caso foi possível observar que a partir de 0.125%, foi encontrado valores significativos de inibição bacteriana. Considerando quantitativamente a análise da densidade óptica do *Bacillus*, confirma-se a concentração inibitória mínima do composto sendo 0.125%, já que a partir da concentração de 0.0625% tem-se um crescimento mais acentuado de células.

| Concentração | Densidade optica | Concentração                                       | Densidade optica |
|--------------|------------------|----------------------------------------------------|------------------|
| 0.5%         | 0.040            | Controle positivo (DMSO 20%)                       | 0.066            |
| 0.25%        | 0.037            | Controle negativo                                  | 0.31             |
| 0.125%       | 0.034            | Controle de toxicidade da cepa em 0.5% de solvente | 0.30             |
| 0.0625%      | 0.17             |                                                    |                  |
| 0.03125%     | 0.25             |                                                    |                  |
| 0.015625%    | 0.30             |                                                    |                  |

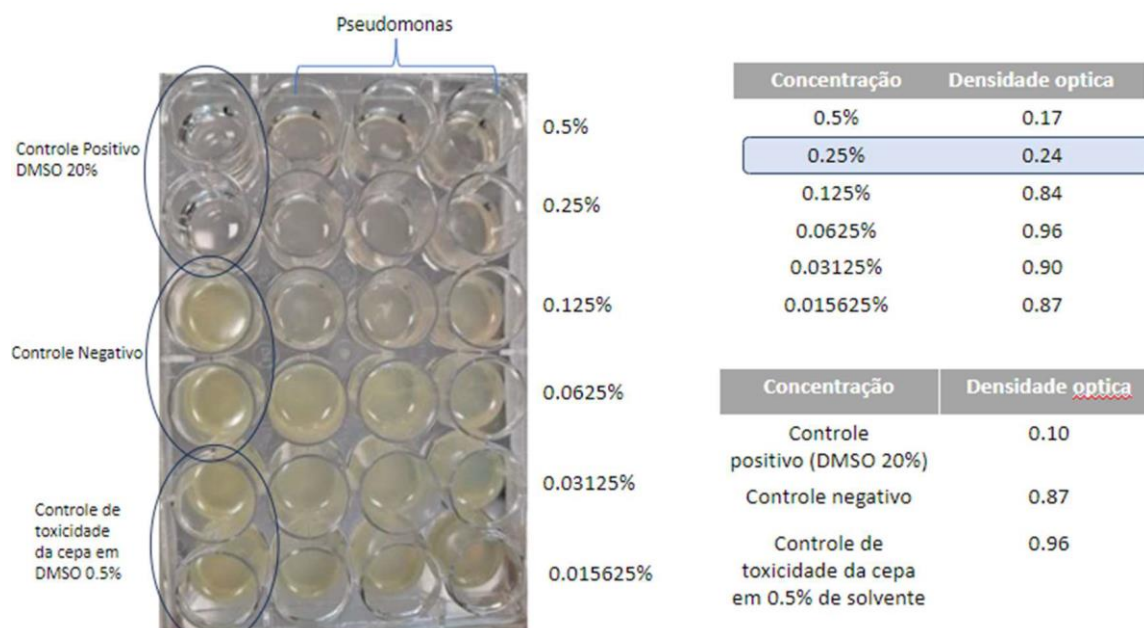
Em relação a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, observa-se um perfil semelhante, apesar do crescimento mais acentuado da mesma, **Figura 9**. Em sua análise visual, as amostras também apresentaram atividade contra o composto BX-15, testado nas concentrações de 0.5% a 0.0156%.





**Figura 9:** Placas de 24 poços contendo Resazurina e a cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

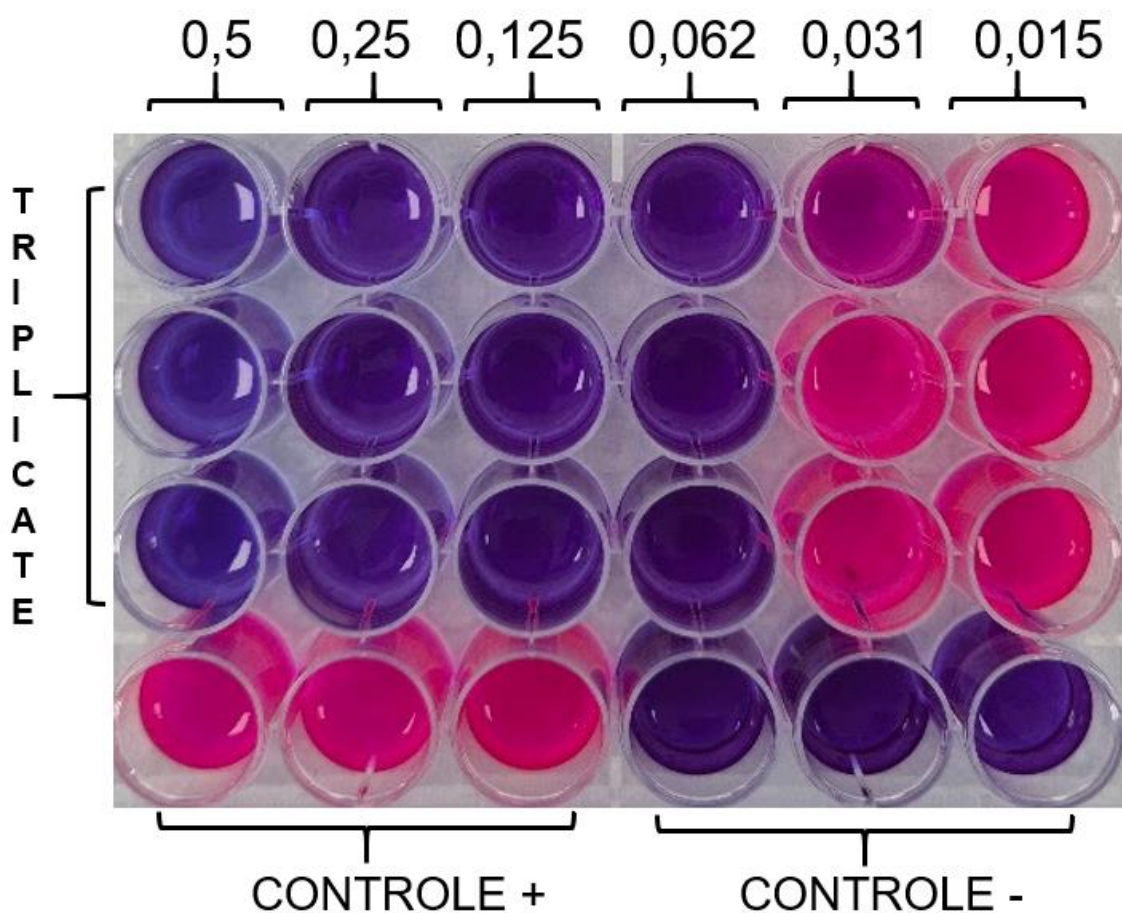
Nas condições estudadas e concentração de células padronizada de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma taxa de crescimento bastante elevada em relação as demais cepas, e pode-se observar visualmente seu crescimento em cada concentração do BIOTREAT BX-15 UNIS. Logo, considerando quantitativamente a análise da densidade óptica, observa-se a concentração inibitória mínima do composto sendo 0.25%, **Figura 10**.



**Figura 10:** Placas de 24 poços e as concentrações da cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

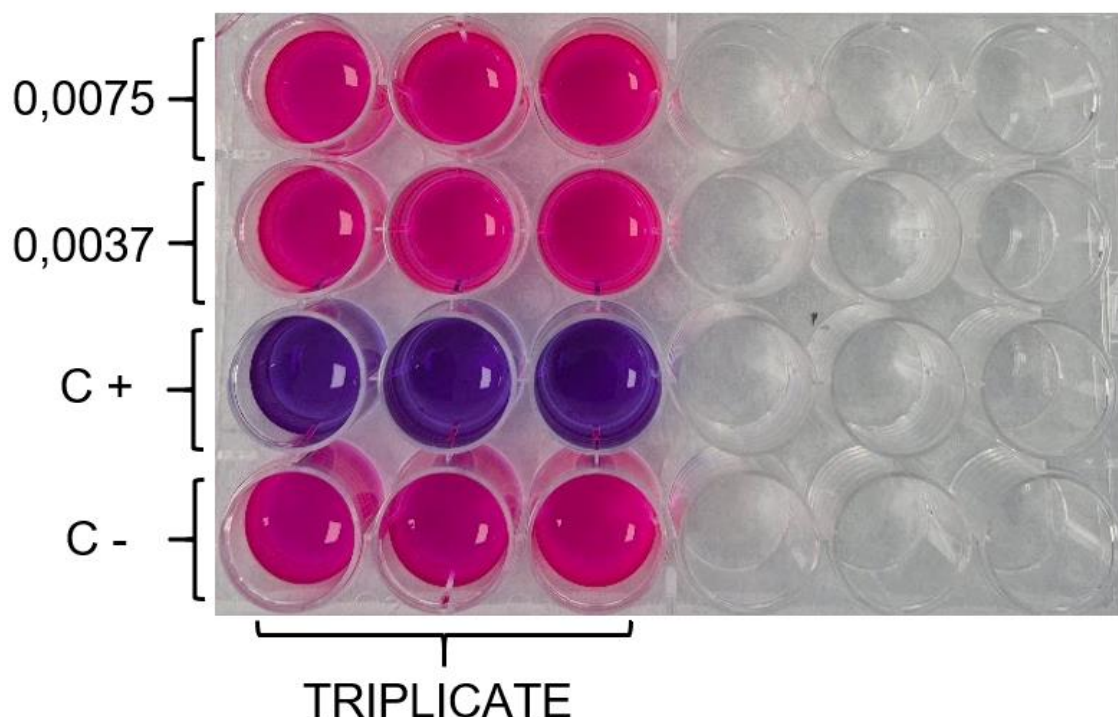
#### Amostras d, e, f:

**Amostra d:** Amostra de Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS. O composto BIOTREAT BX-15 UNIS mostrou a concentração mínima necessária para inibir o crescimento microbiano foi de 0,125 % confirmando-se junto com o crescimento microbiano em placas, **Figuras 11-13.**

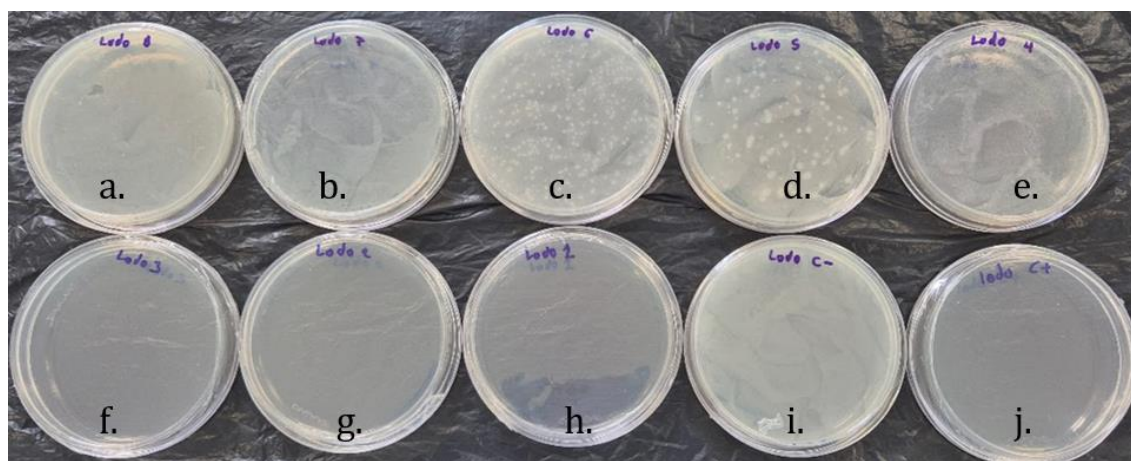


**Figura 11:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da amostra de Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros junto com o inóculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 1%.



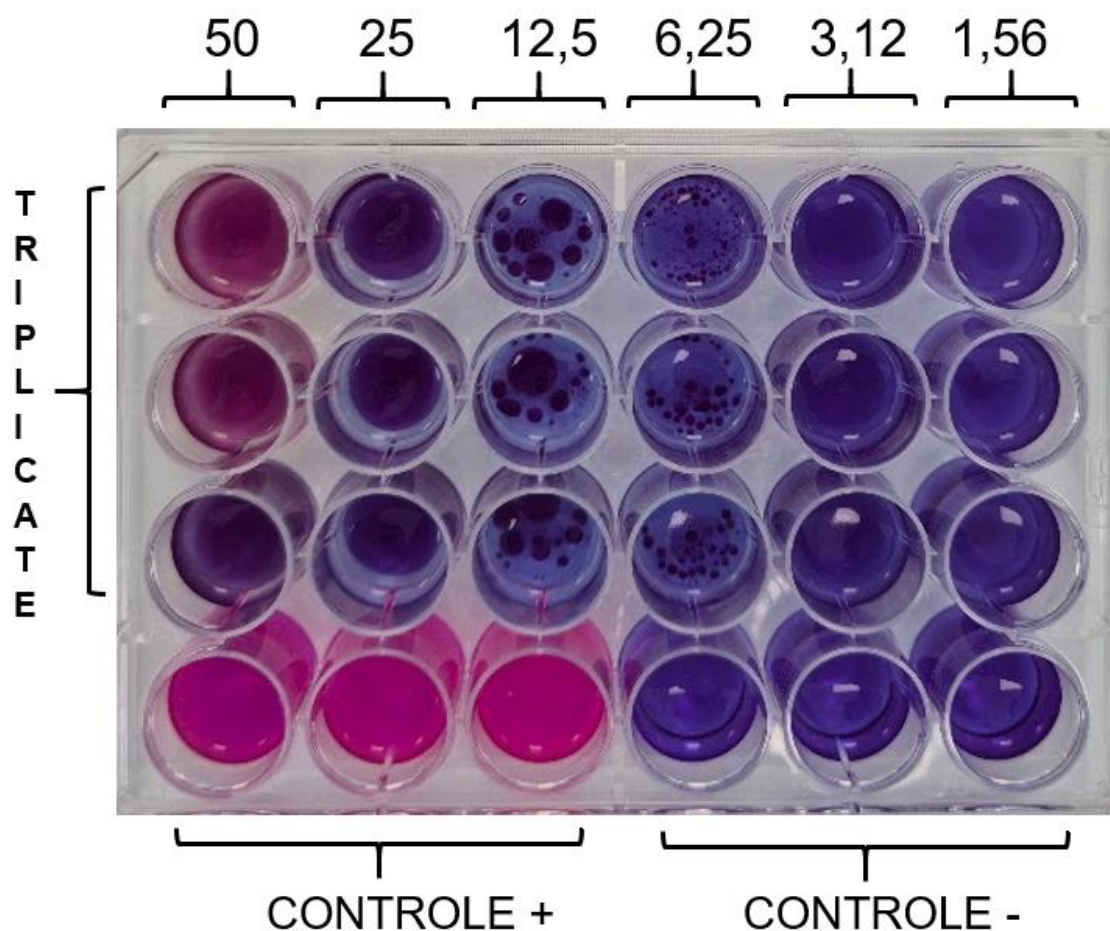


**Figura 12:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da amostra de Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros junto com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 1%.

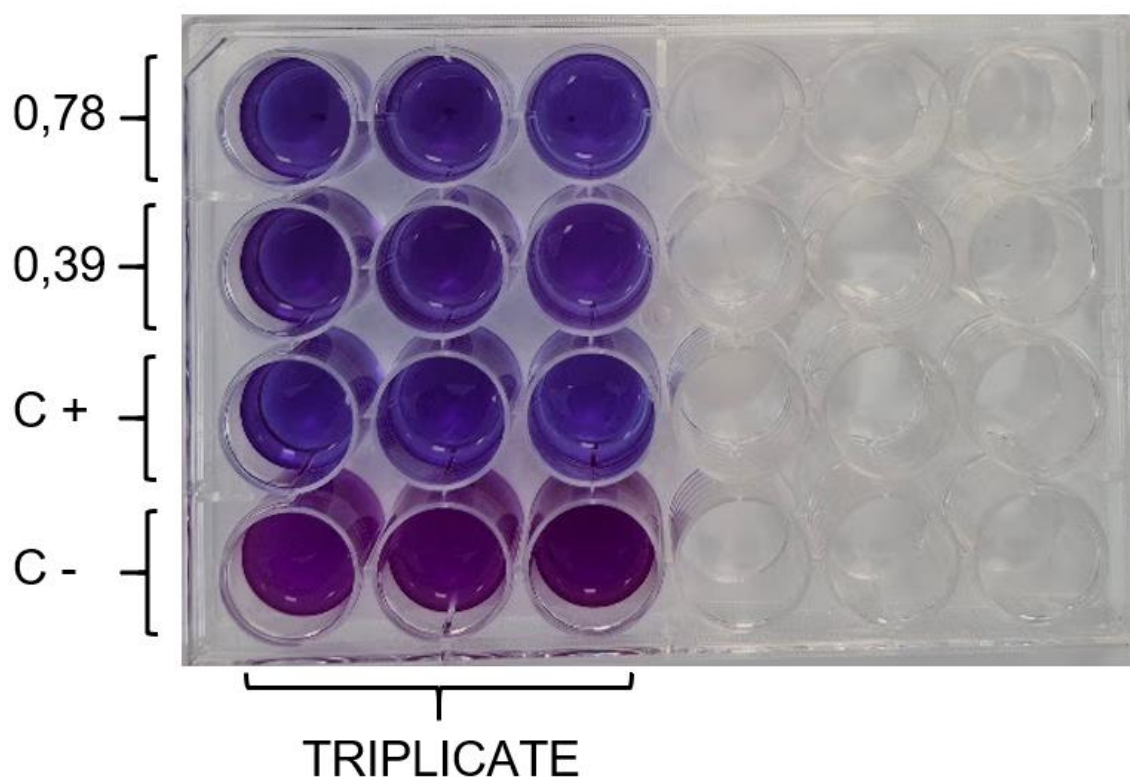


**Figura 13:** Crescimento em placas da amostra de Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros junto com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS nas concentrações: a. 0,0037 %, b. 0,0075 %, c. 0,015 %, d. 0,031 %, e. 0,062 %, f. 0,125 %, g. 0,25 %, h. 0,5 %, i. Controle negativo. J. Controle positivo.

**Amostra e:** Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS. O composto BIOTREAT BX-15 UNIS mostrou a concentração mínima necessária para inibir o crescimento microbiano foi de 1 % confirmando-se junto com o crescimento microbiano em placas, **Figuras 14 21.**

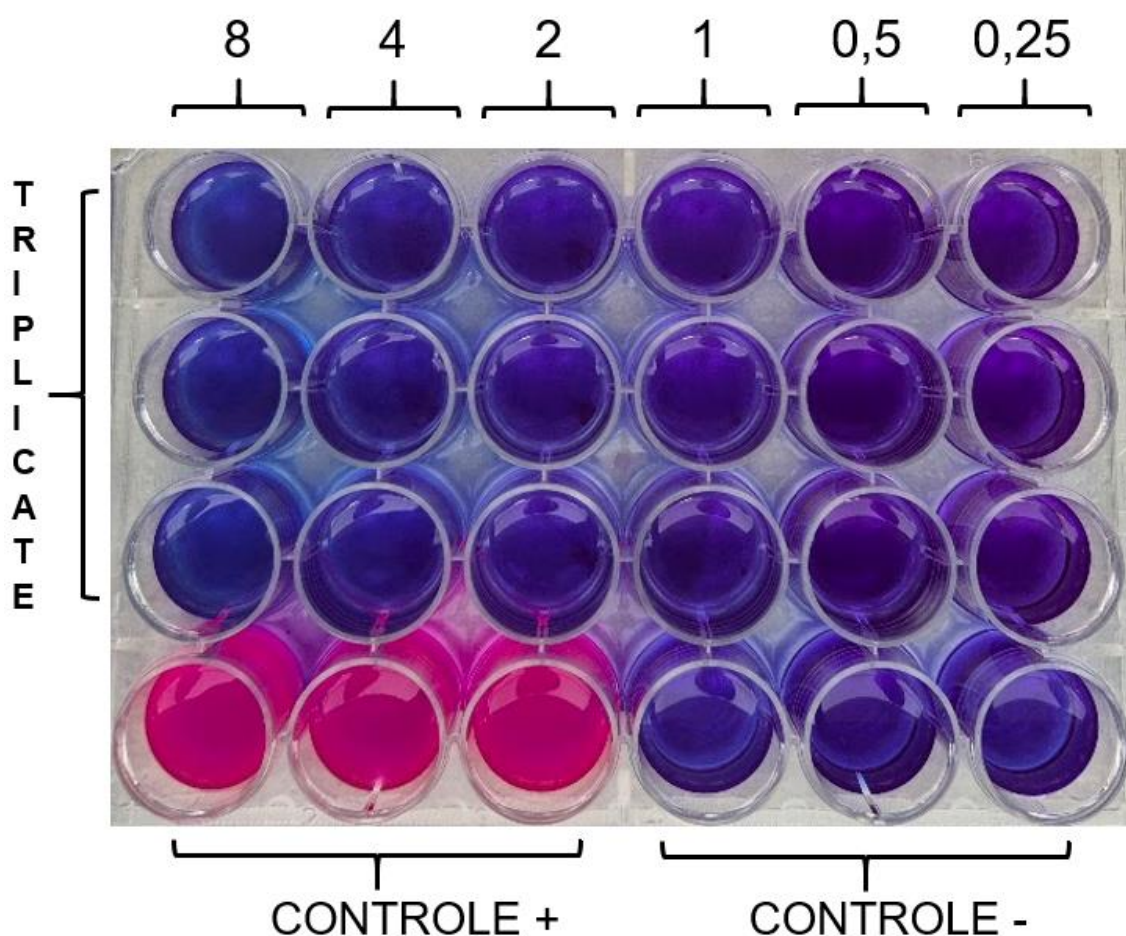


**Figura 14:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 100%.



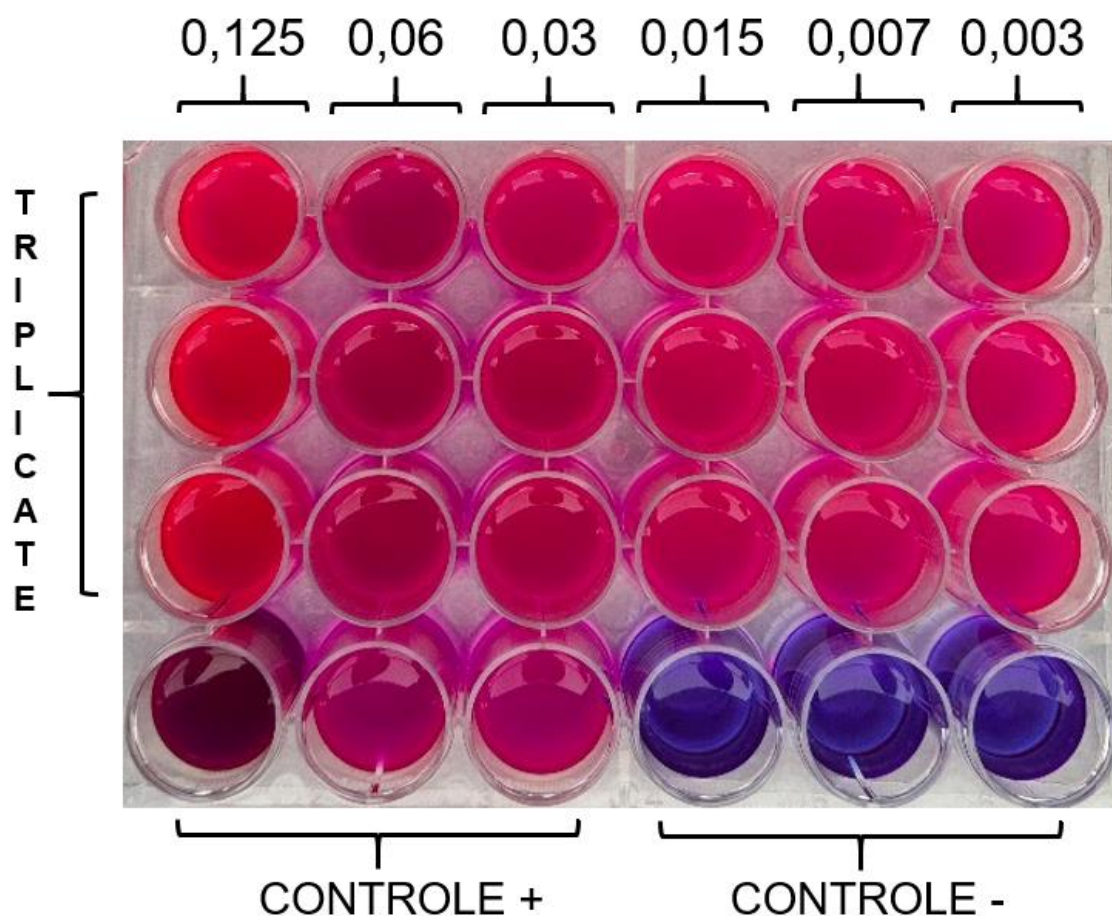
**Figura 15:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 100%.



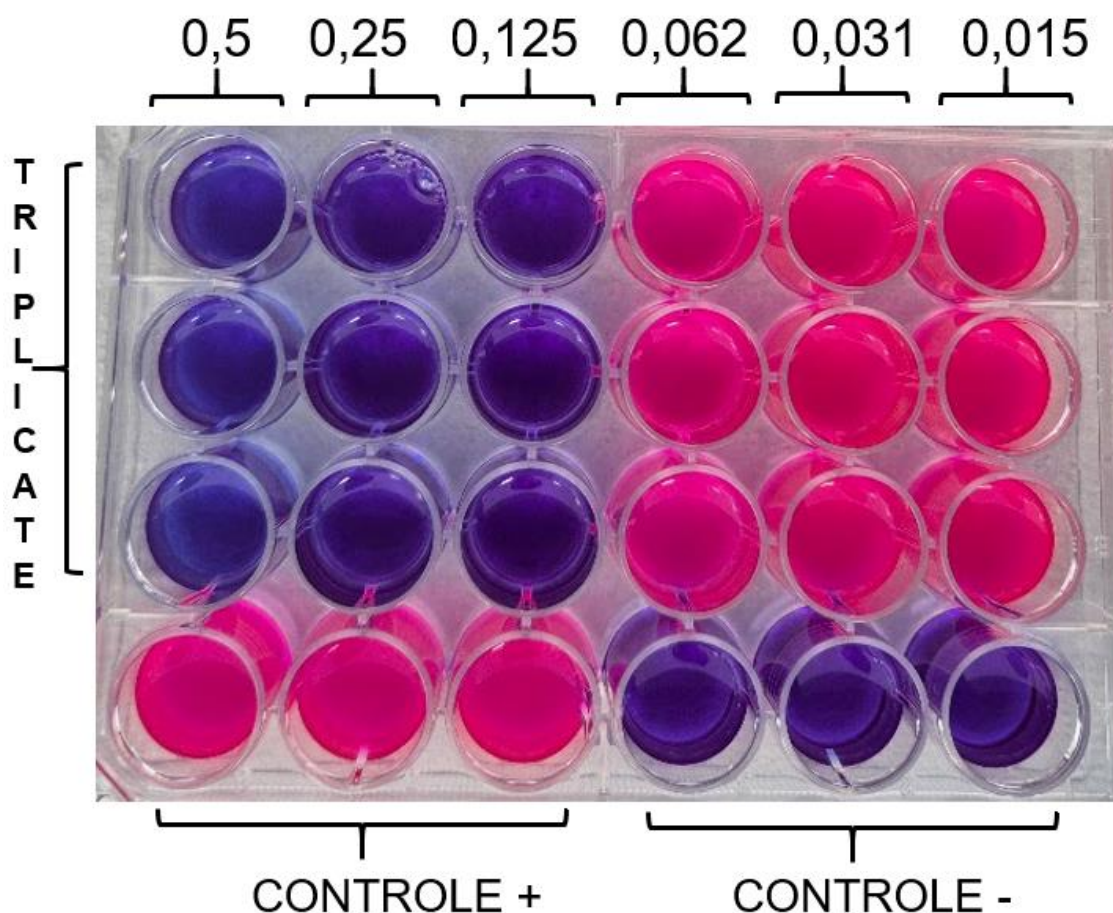


**Figura 16:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco com o inóculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 16%.

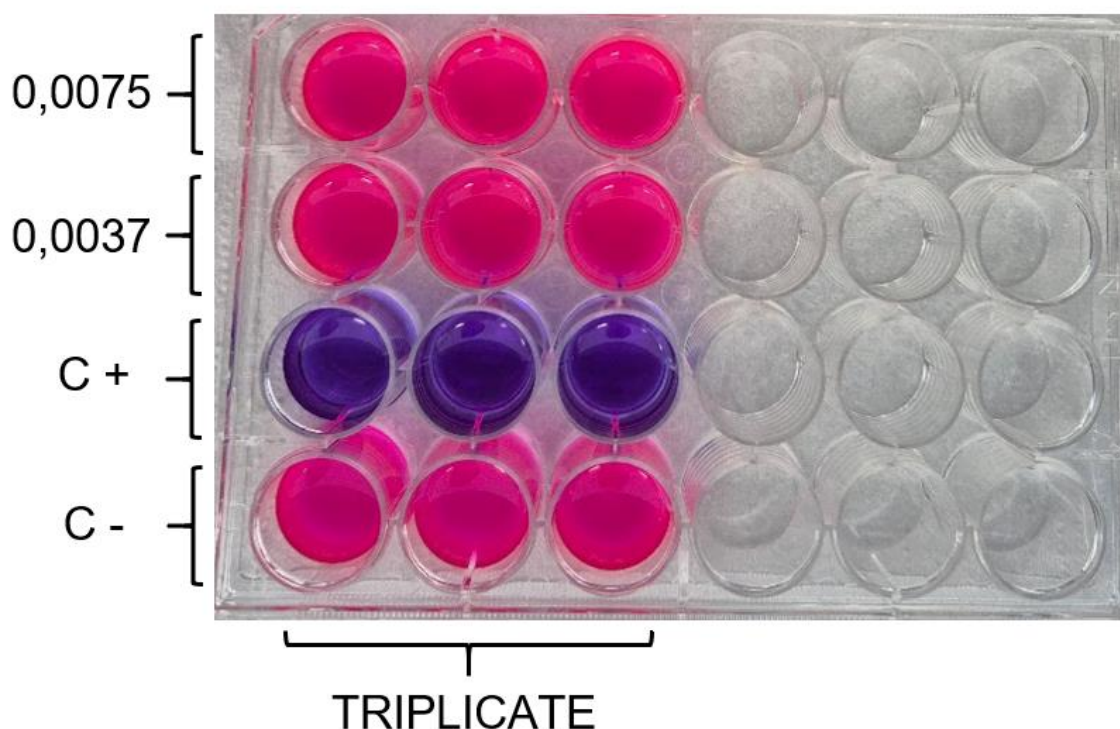




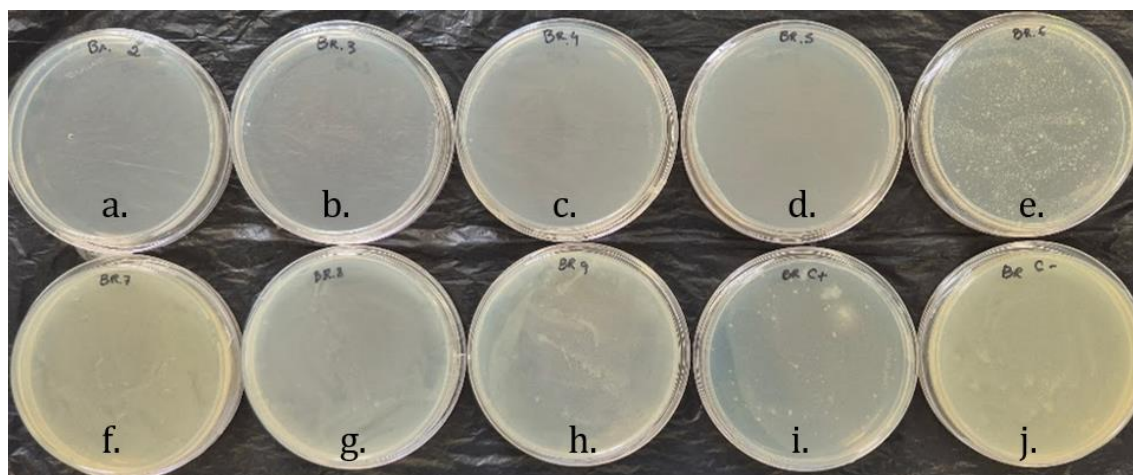
**Figura 17:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco com o inóculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 16%.



**Figura 18:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco com o inóculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 1%.

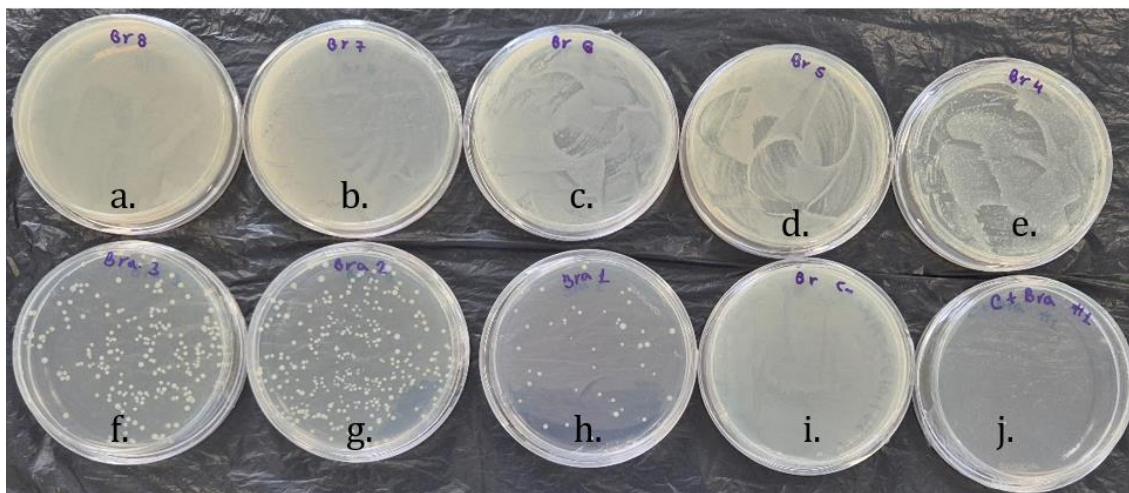


**Figura 19:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da Amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 1%.



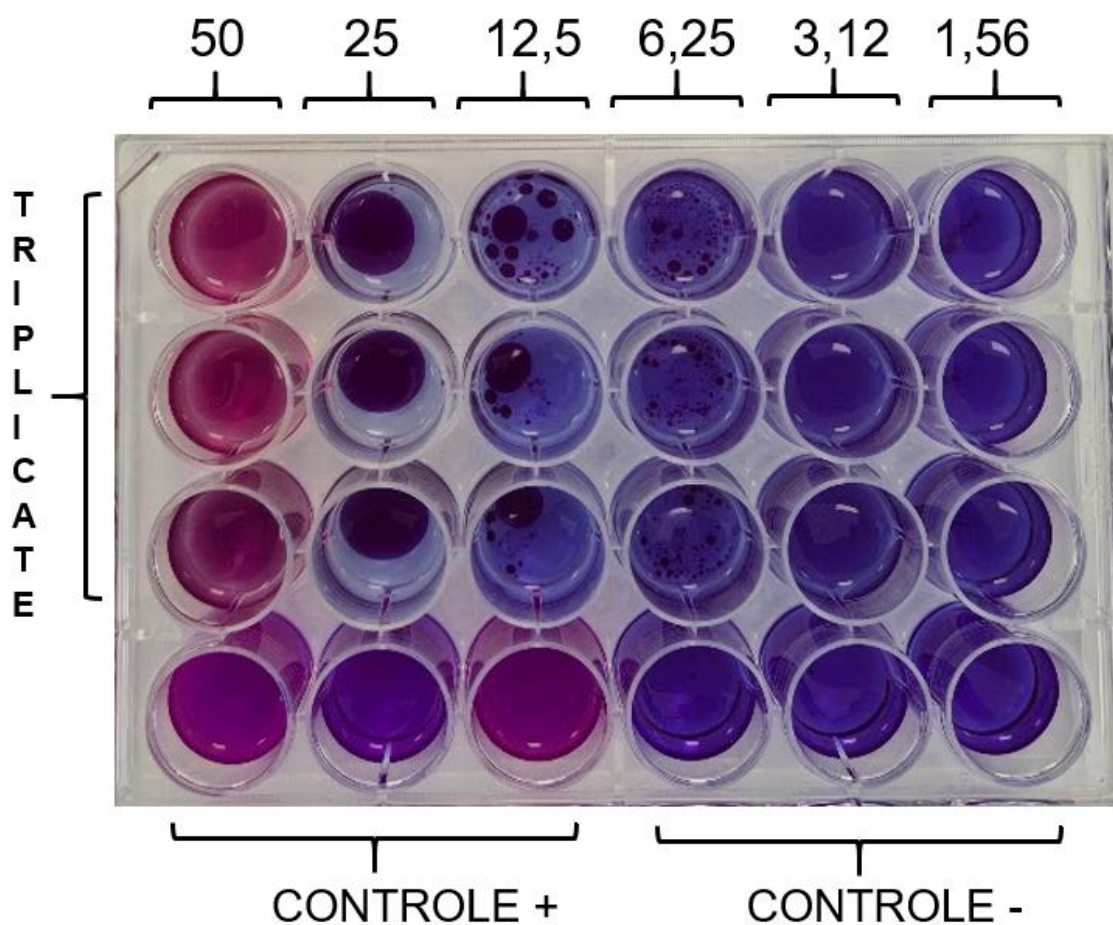
**Figura 20:** Crescimento em placas da amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco junto com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS nas concentrações: a. 8 %, b. 4 %, c. 2 %, d. 1 %, e. 0,5 %, f. 0,25 %, g. 0,125 %, h. 0,062 %, i. Controle negativo. J. Controle positivo, stock 16%. 26





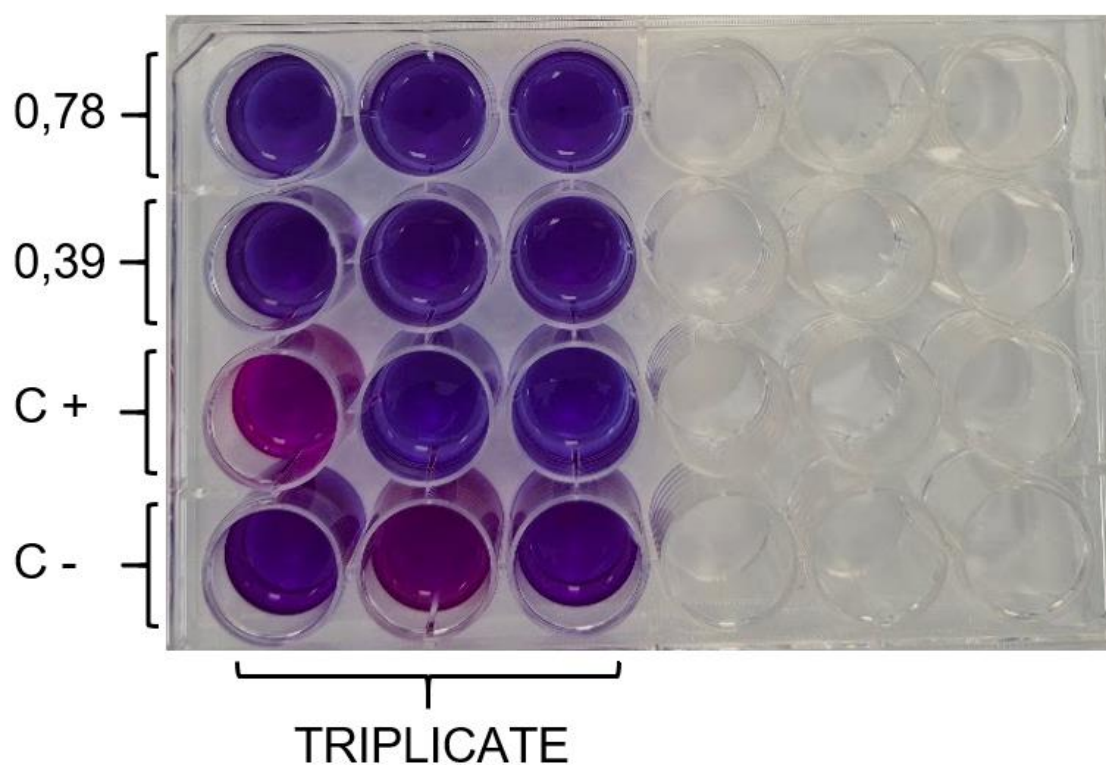
**Figura 21:** Crescimento em placas da amostra de microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco junto com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS nas concentrações: a. 0,0037 %, b. 0,0075 %, c. 0,015 %, d. 0,031%, e. 0,062 %, f. 0,125 %, g. 0,25 %, h. 0,5 %, i. Controle negativo. J. Controle positivo, stock 1%.

**Amostra f:** Amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS. O composto BIOTREAT BX-15 UNIS mostrou a concentração mínima necessária para inibir o crescimento microbiano foi de 0,5 % confirmando-se junto com o crescimento microbiano em placas, **Figuras 22 - 26.**

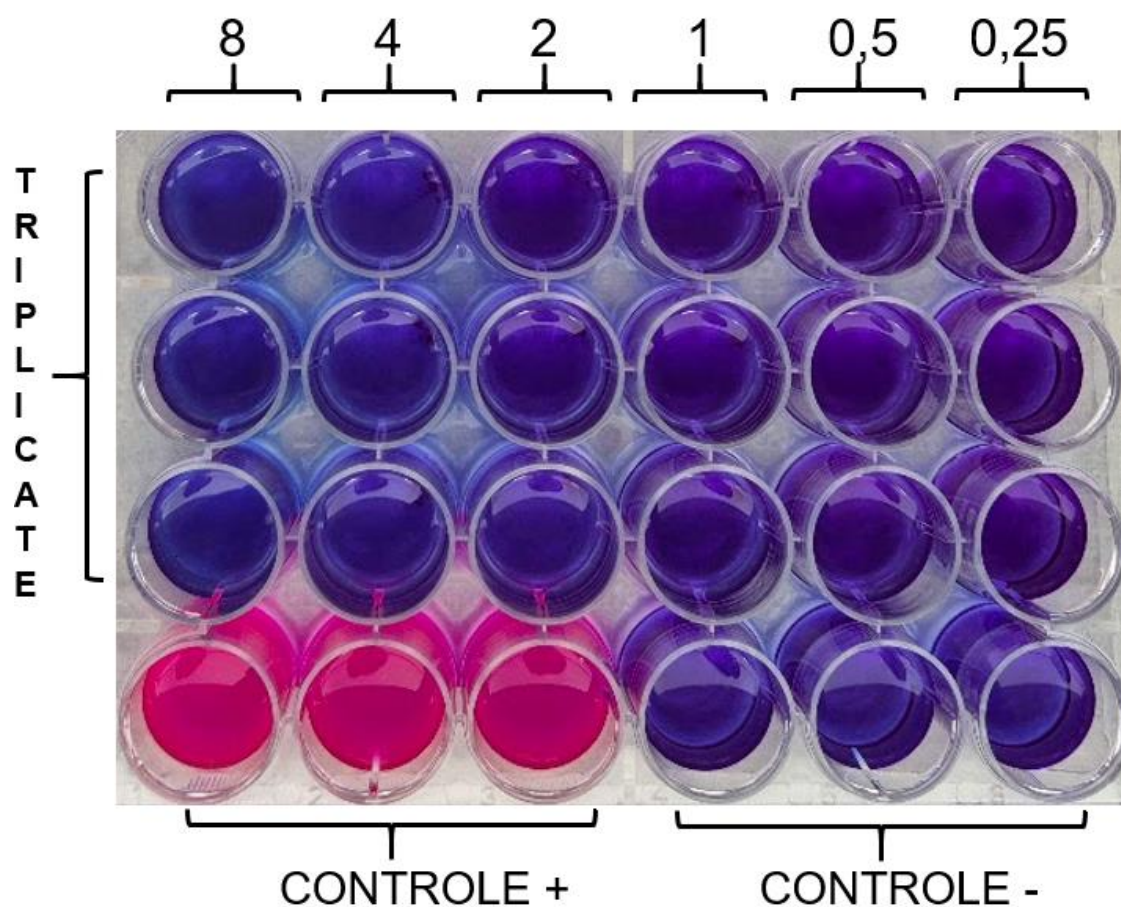


**Figura 22:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado com o inóculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 100 %.

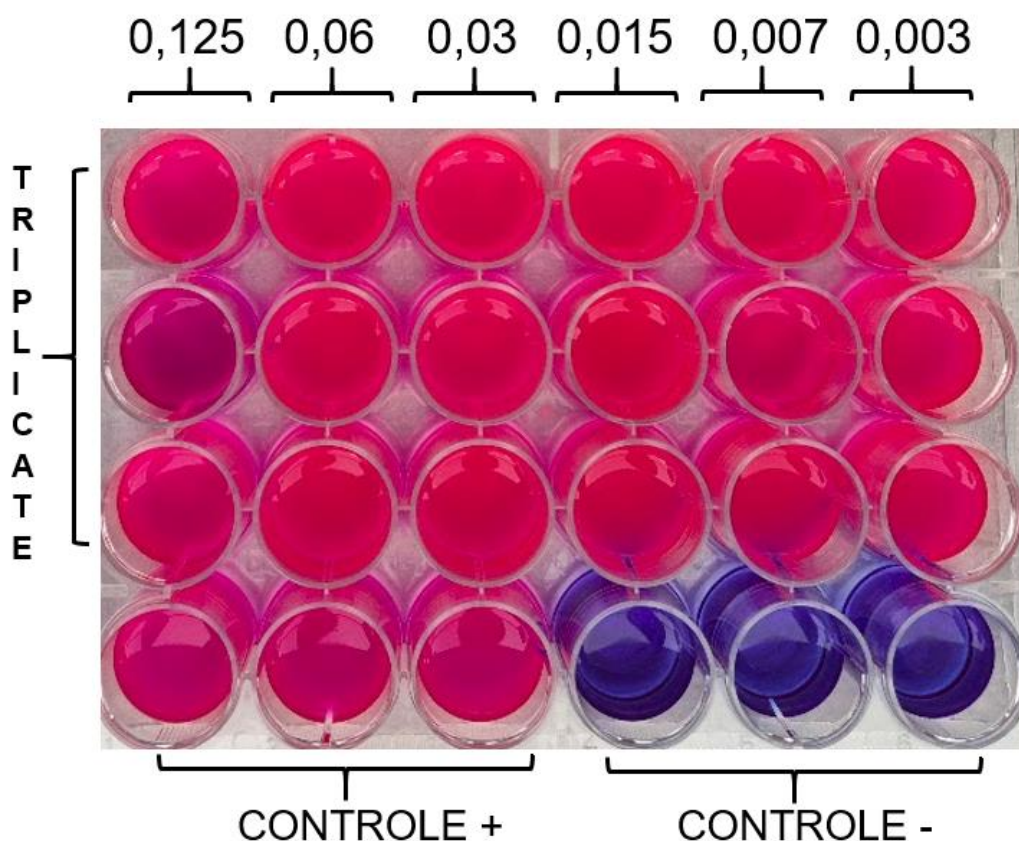




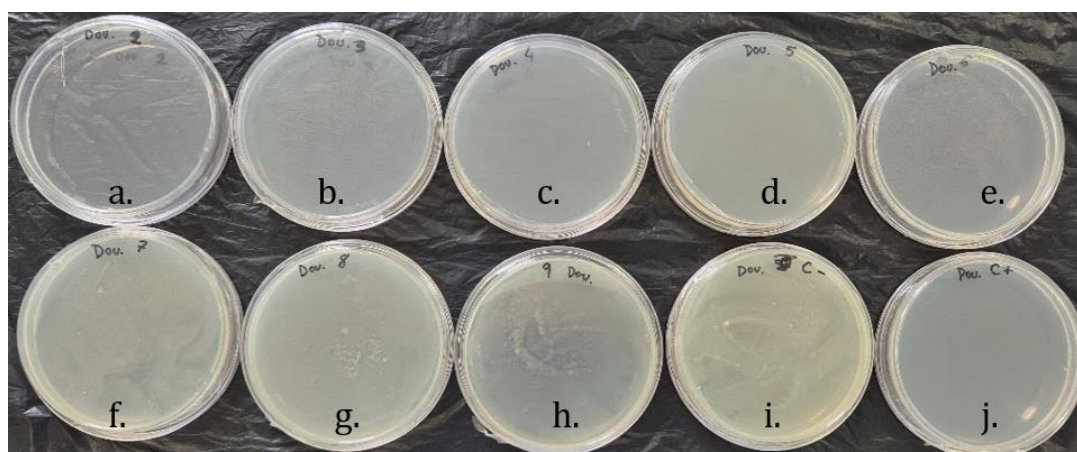
**Figura 23:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 100 %.



**Figura 24:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado com o inóculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 16 %.



**Figura 25:** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) da amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS, stock 16 %.

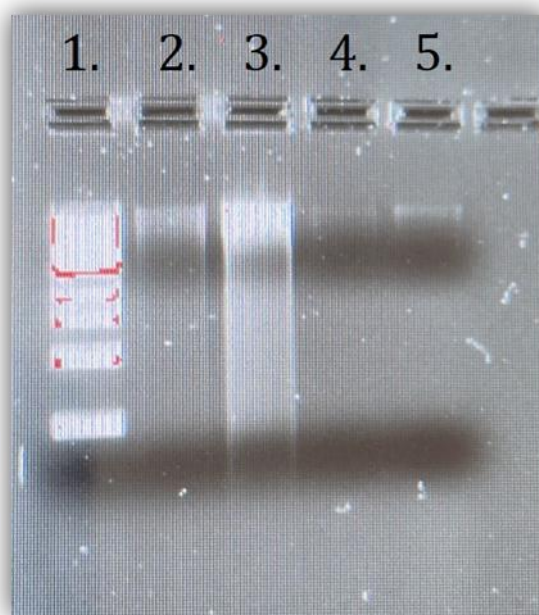


**Figura 26:** Crescimento em placas da amostra de microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado junto com o inoculo de lodo avaliando o composto BIOTREAT BX-15 UNIS nas concentrações: a. 8 %, b. 4 %, c. 2 %, d. 1 %, e. 0,5 %, f. 0,25 %, g. 0,125 %, h. 0,062 %, i. Controle negativo. J. Controle positivo, stock 16%.



### Extração de DNA e sequenciamento

Para a extração de DNA foram extraídas as amostras: Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros (Amostra 1), microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco (Amostra 2), microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado (Amostra 3), lodo coletado da empresa Abatedouro Aves Ideal – FRIGORÍFICO (Amostra 4). Para avaliar a qualidade e integridade das amostras de DNA foi feito usando o Gel de agarose 1% e o equipamento de Nanodrop, **Figura 27** e **Tabela 3**.



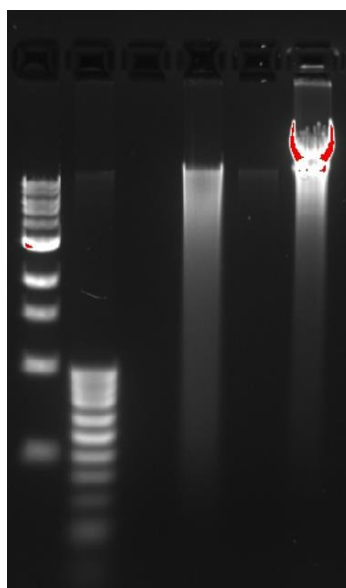
**Figura 27:** DNA extraído das amostras provenientes do Laboratório Universal e Abatedouro Aves Ideal – FRIGORÍFICO. 1. Marcador de peso molecular 1Kb, 2. Amostra 1, 3. Amostra 2, 4. Amostra 3, 5. Amostra 4.

**Tabela 3:** Valores de integridade e concentração das amostras de DNA obtido pelo equipamento de Nanodrop.

| Amostras                                                                                                           | Nanodrop |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|
|                                                                                                                    | 260/280  | [ ] ug/ul |
| Amostra 1: Borra coletada do reservatório do caminhão marca Volvo Modelo TD 102FS de 6 cilindros                   | 1,75     | 37,5      |
| Amostra 2: microrganismos de fluido vegetais como meio de cultura para avaliação de microbicidas branco            | 1,83     | 73,1      |
| Amostra 3: microrganismos de fluidos vegetais e minerais como meio cultural para avaliação de microbicidas dourado | 2,11     | 4,5       |
| Amostra 4: lodo coletado da empresa Abatedouro Aves Ideal – FRIGORÍFICO                                            | 1,84     | 325,1     |

Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando o DNA previamente extraído para iniciar o processo de sequenciamento do gene 16S rRNA, Figura 27. Os resultados obtidos permitem identificar quais amostras estão adequadas para o sequenciamento dessa região do gene, garantindo a qualidade e confiabilidade da análise subsequente; neste caso as amostras 3 e 5 foram as que conseguiram continuar na próxima etapa para sequenciamento.





**Figura 27:** Gel de eletroforese com os amplicons do gene 16S rRNA obtidos por PCR; 1. Marcador de peso molecular 1Kb, 2 Marcador de peso molecular 100 pb., 3. Amostra 1, 4. Amostra 2, 5. Amostra 3. 6. Amostra 4.

A análise das sequências de DNA obtidas a partir da plataforma NextSeq 1000 foi realizada utilizando o pipeline DADA2, permitindo a filtragem, remoção de erros e reconstrução dos amplicons representativos das unidades taxonômicas operacionais (ASVs - Amplicon Sequence Variants) (Harbuzov et al., 2022). Os principais resultados do processamento das leituras podem ser observados na Tabela 4, onde são apresentados os números de sequências após cada etapa do pipeline.

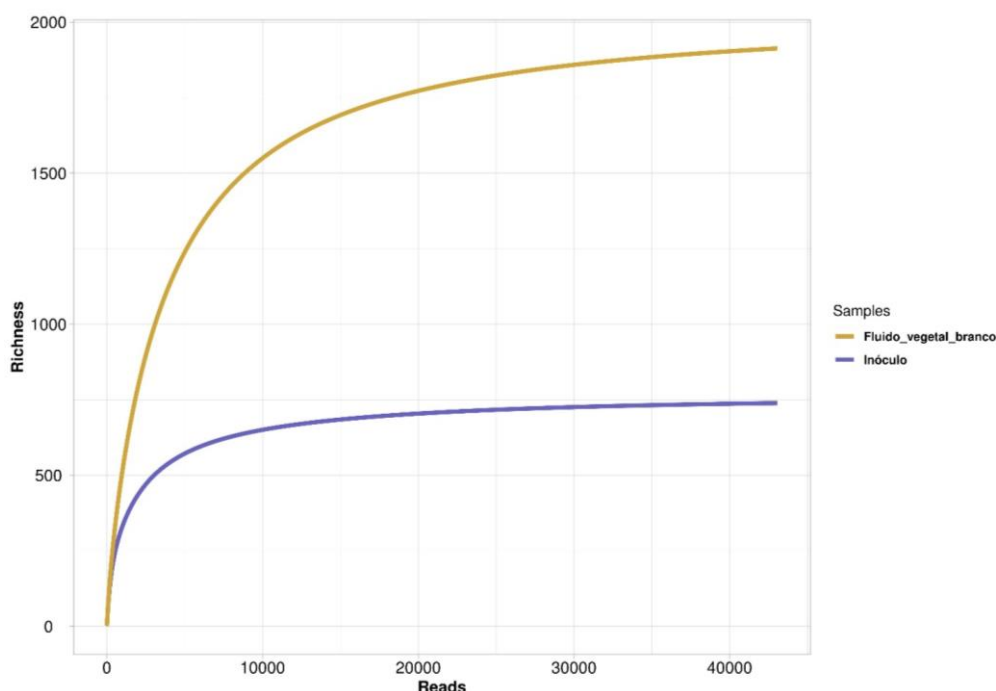
**Tabela 4:** Quantidade de leituras ao longo das diferentes etapas de processamento das amostras pós-sequenciamento.

| ID                           | Filtered | DenoisedF | DenoisedR | Merged | Nonchim |
|------------------------------|----------|-----------|-----------|--------|---------|
| <b>Inóculo</b>               | 94659    | 94123     | 93354     | 92144  | 43060   |
| <b>Fluido_vegetal_branco</b> | 158320   | 157191    | 155331    | 152092 | 73130   |

A análise do processamento das sequências de amplicons revelou diferenças na retenção de leituras entre as amostras "Inóculo" e "Fluido\_vegetal\_branco". 34  
A amostra "Fluido\_vegetal\_branco" apresentou um maior número inicial de

sequências filtradas (158.320) em comparação ao "Inóculo" (94.659), a taxa de retenção é considerada razoável, indicando que, embora o PCR possa ter introduzido artefatos, o impacto na análise final foi moderado. No geral, o pipeline mostrou um bom desempenho na filtragem e processamento das sequências, garantindo a qualidade dos dados para a caracterização da microbiota.

As amostras foram examinadas na riqueza de espécies das taxas a curva de rarefação, Figura 28, ilustra a relação entre o número de leituras (reads) e a riqueza de espécies (richness), isto com a finalidade de avaliar a suficiência do sequenciamento e estimar a diversidade dentro de cada amostra. Observa-se que a amostra Fluido\_vegetal\_branco apresenta uma riqueza consideravelmente maior em comparação ao Inóculo, evidenciada pelo valor mais elevado de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) ao longo do eixo y.



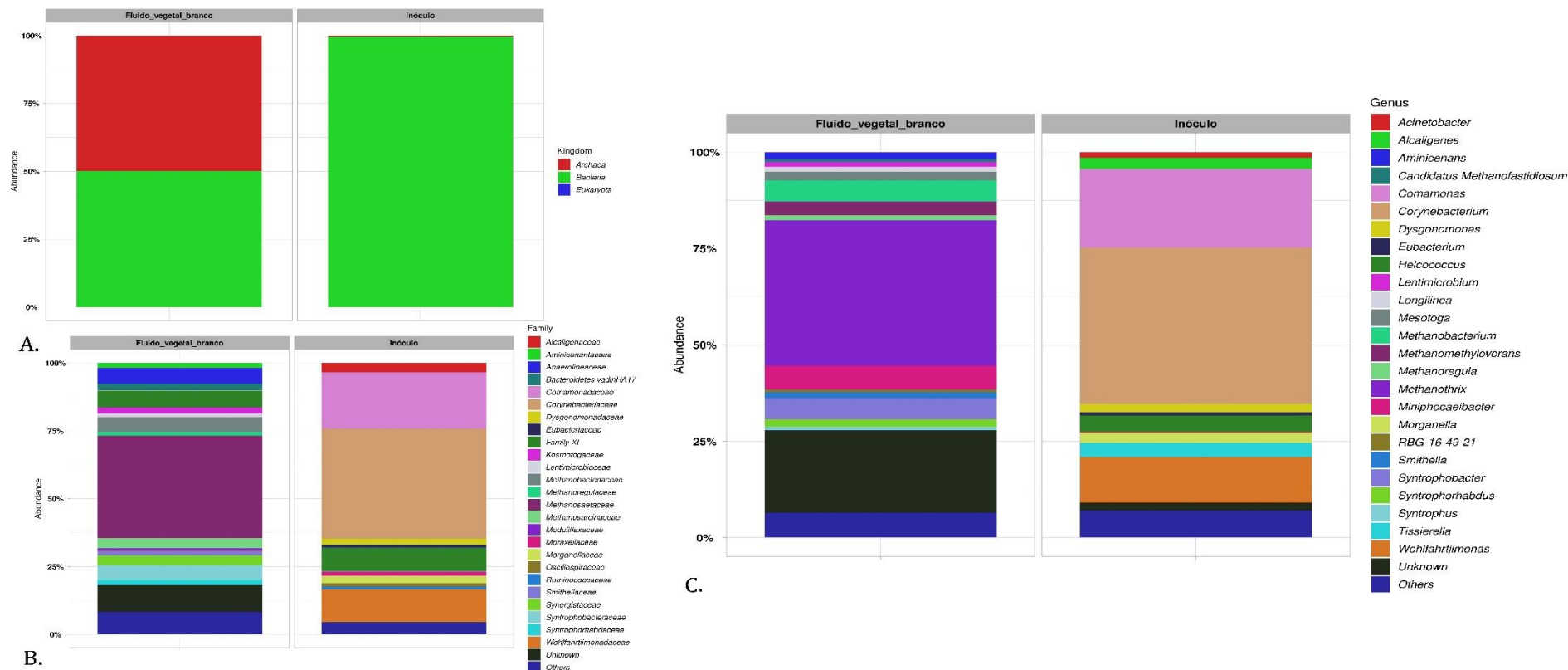
**Figura 28:** Análise da curva de rarefação de espécies observadas em cada amostra.

A abundância relativa dos diferentes grupos taxonômicos encontrados nas amostras, se pode ver na Figura 29, Tabela 5 e anexo; a análise revela uma composição microbiana distinta entre as duas amostras. No Fluido\_vegetal\_branco, há uma maior diversidade de gêneros distribuídos de forma mais equitativa, enquanto no Inóculo observa-se a predominância de alguns poucos táxons, indicando uma comunidade microbiana mais homogênea. Essa diferença na diversidade pode estar relacionada à variabilidade ambiental e às condições seletivas que favorecem certos grupos microbianos em detrimento de outros (Shade, Handelsman & Gilbert, 2013).

A amostra Fluido\_vegetal\_branco apresenta uma comunidade altamente diversificada, caracterizada pela presença de múltiplos gêneros microbianos com abundâncias variadas. Um dos gêneros dominantes é *Methanothrix*, conhecido por seu papel na metanogênese por acetoclasta, um processo essencial no ciclo do carbono em ambientes anaeróbicos (Liu & Whitman, 2008). Outros gêneros metanogênicos, como *Methanobacterium* e *Methanomethylovorans*, também estão presentes, sugerindo um ambiente favorável à produção de metano (Conrad, 2020). Além disso, a diversidade considerável de outros grupos bacterianos reflete uma complexidade ecológica elevada, indicando interações microbianas que sustentam a estabilidade do ecossistema microbiano (Evans et al., 2017).

A amostra Inóculo, por outro lado, apresenta uma estrutura microbiana menos diversa, com poucos gêneros dominando a comunidade. Notavelmente, observa-se um alto percentual de um único gênero (provavelmente *Comamonas*, que aparece em rosa na legenda), indicando a predominância desse táxon. *Comamonas* é frequentemente encontrada em ambientes aquáticos e é conhecida por sua capacidade de degradação de compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos (Willems & Vos, 2006). Outros gêneros presentes em quantidades menores incluem *Dysgonomonas* e *Methanothrix*, 36

mas sua participação relativa é reduzida em comparação à amostra Fluido\_vegetal\_branco. Essa composição sugere um ambiente microbiológico mais especializado e mais seletivo para certos grupos microbianos (Fierer & Jackson, 2006).



**Figura 29:** Composição Taxonômica e Abundância Relativa das amostras, apresentando os 25 principais táxons no nível de: A. Reino, B. Família, C. Gênero da abundância relativa total de leituras de sequências identificadas.

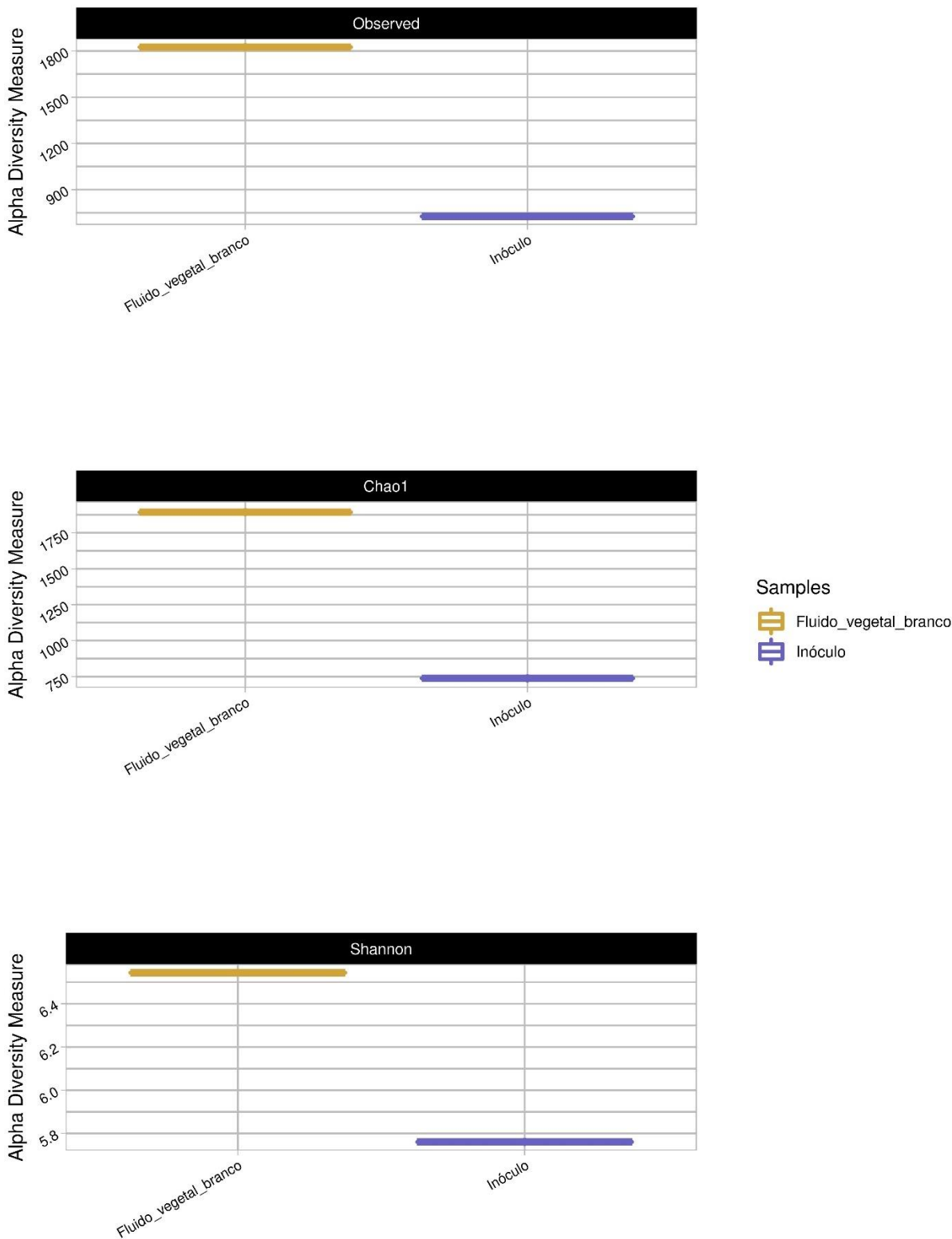


**Tabela 5:** Abundância Relativa porcentual dos Principais Táxons nas Amostras.

| Inóculo  | Fluido vegetal branco | Kingdom | Phylum             | Class           | Order                       | Family            | Genus                         |
|----------|-----------------------|---------|--------------------|-----------------|-----------------------------|-------------------|-------------------------------|
| 0,060381 | 0                     | Bateria | Pseudmnadta        | Gammartebateria | Pseudmnadales               | Mraxellaeae       | Acinetobacter                 |
| 0,185787 | 0                     | Bateria | Pseudmnadta        | Gammartebateria | Burkhllderiales             | Alalienaeae       | Alcaligenes                   |
| 0        | 0,071106              | Bateria | Aidbaterita        | Aminienantia    | Aminienantales              | Aminienantaeae    | Aminicenans                   |
| 0        | 0,050595              | Arhaea  | Methanbaterita     | Thermi          | Methanastidisales           | Methanastidisaeae | Candidatus Methanofastidiosum |
| 0,534138 | 0                     | Bateria | Pseudmnadta        | Gammartebateria | Burkhllderiales             | Cmamnadaeae       | Comamonas                     |
| 1,107757 | 0                     | Bateria | Atinmyetta         | Atinbateria     | Mybateriales                | Crynebateriaeae   | Corynebacterium               |
| 0,085927 | 0                     | Bateria | Bateridta          | Bateridia       | Bateridales                 | Dysnmnadaeae      | Dysgonomonas                  |
| 0,060381 | 0                     | Bateria | Baillta            | Clstridia       | Eubateriales                | Eubateriaeae      | Eubacterium                   |
| 0,271714 | 0                     | Bateria | Baillta            | Clstridia       | Petstretales-Tissierellales | Family XI         | Helcococcus                   |
| 0        | 0,038288              | Bateria | Bateridta          | Bateridia       | Shinbateriales              | Lentimirbiaeae    | Lentimicrobium                |
| 0        | 0,083413              | Bateria | Chlrlexta          | Anaerlineae     | Anaerlineales               | Anaerlineaeae     | Longilinea                    |
| 0        | 0,098455              | Bateria | Thermtta           | Thermtae        | Ksmtales                    | Ksmtaeae          | Mesotoga                      |
| 0        | 0,117599              | Arhaea  | Methanbaterita     | Methanbateria   | Methanbateriales            | Methanbateriaeae  | Methanobacterium              |
| 0        | 0,1805                | Arhaea  | Halbaterita        | Methansarinia   | Methansarinales             | Methansarinaeae   | Methanomethylovorans          |
| 0        | 0,071106              | Arhaea  | Halbaterita        | Methanmirbia    | Methanmirbiales             | Methanreulaeae    | Methanoregula                 |
| 0        | 0,288527              | Bateria | Baillta            | Clstridia       | Petstretales-Tissierellales | Family XI         | Miniphocaeibacter             |
| 0,183465 | 0                     | Bateria | Pseudmnadta        | Gammartebateria | Enterbaterales              | Mranellaeae       | Morganella                    |
| 0        | 0,043758              | Bateria | Sirhaetta          | Letsirae        | Letsirales                  | Letsiraeae        | RBG-16-49-21                  |
| 0        | 0,049227              | Bateria | Thermdesulbaterita | Syntrhia        | Syntrhales                  | Smithellaeae      | Smithella                     |
| 0        | 0,060167              | Bateria | Thermdesulbaterita | Syntrhrhabdia   | Syntrhrhabdales             | Syntrhrhabdaeae   | Syntrophorhabdus              |
| 0        | 0,259811              | Bateria | Thermdesulbaterita | Syntrhbateria   | Syntrhbaterales             | Syntrhbateraeae   | Syntrophobacter               |
| 0        | 0,041023              | Bateria | Thermdesulbaterita | Syntrhia        | Syntrhales                  | Syntrhaeae        | Syntrophus                    |
| 0,164886 | 0                     | Bateria | Baillta            | Clstridia       | Petstretales-Tissierellales | Family XI         | Tissierella                   |
| 0,750116 | 0                     | Bateria | Pseudmnadta        | Gammartebateria | Cardibateriales             | Whlahrtiimnadaeae | Wohlahrtiimonas               |

A **Figura 30** apresenta três métricas distintas de diversidade alfa para as amostras Fluido\_vegetal\_branco e Inóculo: Observed, Chao1 e Shannon. Essas métricas são amplamente utilizadas para avaliar a diversidade microbiana dentro de uma amostra, permitindo comparações sobre riqueza e equitabilidade das comunidades presentes.

A métrica Observed representa o número real de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) detectadas em cada amostra. O gráfico mostra claramente que a amostra Fluido\_vegetal\_branco possui uma riqueza observada maior que a do Inóculo, com valores próximos de 1800 e 900, respectivamente. Essa diferença sugere que a microbiota presente no fluido vegetal contém uma diversidade significativamente maior de organismos em comparação ao inóculo. A métrica Chao1 é um estimador da riqueza total da comunidade, incluindo OTUs raros que podem não ter sido completamente amostrados. O comportamento observado no gráfico Chao1 é similar ao da riqueza observada, com Fluido\_vegetal\_branco apresentando um valor estimado de diversidade superior a 1750, enquanto Inóculo apresenta uma estimativa em torno de 800. Isso reforça a ideia de que a comunidade microbiana do fluido vegetal contém uma riqueza substancialmente maior de espécies, mesmo considerando aquelas que podem ter sido subamostradas no sequenciamento. E por último o índice de Shannon combina riqueza e equitabilidade (uniformidade da distribuição das espécies). Enquanto os gráficos anteriores destacam a maior riqueza do Fluido\_vegetal\_branco, a métrica de Shannon apresenta um menor contraste entre as amostras. O índice de Shannon para Fluido\_vegetal\_branco é ligeiramente superior a 6.4, enquanto o Inóculo apresenta um valor próximo de 5.8. Essa diferença sugere que, embora o fluido vegetal possua maior riqueza, a distribuição das abundâncias entre as espécies é relativamente semelhante entre as amostras.



**Figura 30:** Análise da Diversidade Alfa das Amostras Baseada nos Índices Observed, Chao1 e Shannon.

## CONCLUSÕES

A concentração mínima inibitória obtida nos ensaios para as amostras a, b, c, foram:

- *Escherichia coli* ATCC 25922 = 0,250 %
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 = 0,250 %
- *Bacillus megaterium* = 0,125 %

O composto BX-15 é um produto lipofílico, hidrofóbico, perfeitamente miscíveis com biodiesel, diesel e suas misturas até 15% de biodiesel e passou em todos os ensaios termodinâmicos, físico-químicos, biológicos, apresentando-se como a melhor opção do momento para atender as necessidades decorrentes dos problemas gerados, evitando sobre maneira os elevados custos que acarretam a manutenção dos motores ciclo diesel.

O composto BIOTREAT BX-15 UNIS demonstrou eficácia variável na inibição do crescimento microbiano dependendo da amostra avaliada. Na Amostra d, coletada da borra do reservatório de um caminhão Volvo TD 102FS, a concentração mínima necessária foi de 0,125%, evidenciando maior eficiência nesse meio. Já na Amostra e, composta por microrganismos de fluidos vegetais, foi necessário 1% do composto para alcançar a inibição. Por fim, na Amostra f, contendo microrganismos provenientes de fluidos vegetais e minerais, a concentração mínima foi de 0,5%. Esses resultados indicam que a eficiência do BIOTREAT BX-15 UNIS varia conforme a composição e características do meio cultural.

A análise do processamento das sequências de amplicons revelou diferenças significativas na retenção de leituras e na diversidade microbiana entre as amostras. A amostra Fluido\_vegetal\_branco apresentou um maior número de sequências filtradas e uma maior riqueza de espécies, indicando uma comunidade microbiana mais diversa e distribuída de maneira mais equitativa. A curva de rarefação confirmou essa diferença, evidenciando uma riqueza superior de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) na amostra Fluido\_vegetal\_branco. A análise de diversidade alfa, utilizando métricas como Observed, Chao1 e Shannon, corroborou esse achado, mostrando que essa

amostra possui uma microbiota mais rica e complexa. A composição taxonômica revelou que Fluido\_vegetal\_branco abriga uma comunidade microbiana variada, incluindo gêneros metanogênicos como Methanotherix, Methanobacterium e Methanomethylovorans, indicando um ambiente favorável à produção de metano. Em contraste, Inóculo apresentou menor diversidade, com a predominância de um único gênero, possivelmente Comamonas, caracterizando uma comunidade mais especializada e seletiva.

**Autores:**

Eng. Quím. Emerson Leite - Laboratórios Universal Ind e Com Ltda

Eng. Quím. Leonard Giordanni Batista - Laboratórios Universal Ind Com Ltda

Dr. Tiago Palladino Delforno - ISI - Biotecnologia

Dr<sup>a</sup> Isabel Teresa Santos Correa - ISI – Biotecnologia

Dr<sup>a</sup> Angie Alejandra Calderon Fajardo - ISI – Biotecnologia

Dr<sup>a</sup> Erica Janaina Rodrigues de Almeida - ISI – Biotecnologia



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Achinas, S., Achinas, V., & Euverink, G. J. W. (2017). A Technological Overview of Biogas Production from Biowaste. *Engineering*, 3(3), 299–307. <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.03.002>
- AKINNAWO, Solomon Oluwaseun. Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies. *Environmental Challenges*, v. 12, p. 100733, 2023.
- An, D., Wang, T., Zhou, Q., Wang, C., Yang, Q., Xu, B., & Zhang, Q. (2017). Effects of total solids content on performance of sludge mesophilic anaerobic digestion and dewaterability of digested sludge. *Waste Management*, 62, 188–193. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2017.01.042>
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly.
- AYITI, Oluwatobi Esther; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Factors influencing soil nitrification process and the effect on environment and health. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, v. 6, p. 821994, 2022.
- Bachmann, N. (2015). Sustainable biogas production in municipal wastewater treatment plants.
- Beals, E. W. (2008). Bray-Curtis Ordination: An Effective Strategy for Analysis of Multivariate Ecological Data (Vol. 14, pp. 1–55). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60168-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60168-3)
- BONASSA, Gabriela et al. Organic carbon bioavailability: Is it a good driver to choose the best biological nitrogen removal process?. *Science of the Total Environment*, v. 786, p. 147390, 2021.
- Borowski, S., Domański, J., & Weatherley, L. (2014). Anaerobic co-digestion of swine and poultry manure with municipal sewage sludge. *Waste Management*, 34(2), 513–521. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2013.10.022>
- Calbry-Muzyka, A., Madi, H., Rüsche-Pfund, F., Gandiglio, M., & Biollaz, S. (2022). Biogas composition from agricultural sources and organic fraction of municipal solid waste. *Renewable Energy*, 181, 1000–1007. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2021.09.100>

- Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., et al. (2012). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5), 335-336. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., Fierer, N., & Knight, R. (2010). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(Supplement\_1), 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000080107>
- Costa, O. Y. A., De Hollander, M., Pijl, A., Liu, B., & Kuramae, E. E. (2020). Cultivation-independent and cultivation-dependent metagenomes reveal genetic and enzymatic potential of microbial community involved in the degradation of a complex microbial polymer. *Microbiome*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00836-7>
- Development, O. of R. &. (n.d.). *Selected Analytical Methods for Environmental Remediation and Recovery (SAM)* 2017.
- Harbuzov, Z., Farberova, V., Tom, M., Pallavicini, A., Stanković, D., Lotan, T., & Lubinevsky, H. (2022). Amplicon sequence variant-based meiofaunal community composition revealed by DADA2 tool is compatible with species composition. *Marine Genomics*, 65, 100980. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2022.100980>
- HE, Huan et al. Removal of natural organic matter in full-scale conventional and advanced water treatment plants: Assimilable organic carbon and its precursors. *Chemical Engineering Journal Advances*, v. 8, p. 100183, 2021.
- Hidalgo, K. J., Teramoto, E. H., Soriano, A. U., E. Valoni, M.P. Baessa, H.H. Richnow, Vogt, C., Chang, H. K., & Oliveira, V. M. (2020). Taxonomic and functional diversity of the microbiome in a jet fuel contaminated site as revealed by combined application of in situ microcosms with metagenomic analysis. *Science of the Total Environment*, 708, 135152–135152. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135152>
- Jameel, M. K., Mustafa, M. A., Ahmed, H. S., Mohammed, A. jassim, Ghazy, H., Shakir, M. N., Lawas, A. M., Mohammed, S. khudhur, Idan, A. H., Mahmoud, Z. H., Sayadi, H., & Kianfar, E. (2024a). Biogas: Production, properties, applications, economic and challenges: A review. *Results in Chemistry*, 7, 101549. <https://doi.org/10.1016/J.RECHEM.2024.101549>
- Jameel, M. K., Mustafa, M. A., Ahmed, H. S., Mohammed, A. jassim, Ghazy, H., Shakir, M. N., Lawas, A. M., Mohammed, S. khudhur, Idan, A. H., Mahmoud, Z.

- H., Sayadi, H., & Kianfar, E. (2024b). Biogas: Production, properties, applications, economic and challenges: A review. *Results in Chemistry*, 7, 101549. <https://doi.org/10.1016/J.RECHEM.2024.101549>
- JOHNRAVINDAR, Davidraj et al. Impact of total solids content on biochar amended co-digestion of food waste and sludge: Microbial community dynamics, methane production and digestate quality assessment. *Bioresource Technology*, v. 361, p. 127682, 2022.
- JOHNRAVINDAR, Davidraj et al. Impact of total solids content on biochar amended co-digestion of food waste and sludge: Microbial community dynamics, methane production and digestate quality assessment. *Bioresource Technology*, v. 361, p. 127682, 2022.
- Kotu, V., & Deshpande, B. (2019, January 1). Chapter 4 - Classification (V. Kotu & B. Deshpande, Eds.). ScienceDirect; Morgan Kaufmann. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780128147610000046>
- Kougias, P. G., Treu, L., Campanaro, S., Zhu, X., & Angelidaki, I. (2016). Dynamic functional characterization and phylogenetic changes due to Long Chain Fatty Acids pulses in biogas reactors. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep28810>
- KUNZ, A., STEINMETZ, R. L. R., & AMARAL, A. C. do. (2022). Fundamentos da digestão anaeróbia, purificação do biogás, uso e tratamento do digestato. <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1141618>
- Larsen, P. E., Karlen, D., & Li, X. (2018). *Bioinformatics for Microbiome Research: Methods and Applications*. Springer.
- LIU, Benhong; LIU, Lei; LI, Wei. Effective removal of phosphorus from eutrophic water by using cement. *Environmental research*, v. 183, p. 109218, 2020.
- Liu, L., Zhang, R., & Yang, J. (2020). Microbial communities in wastewater treatment systems and their applications in biorremediation. *Environmental Pollution*, 259, 113895. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113895>
- López-Vázquez, C. M., et al. (2016). Microbial communities involved in the treatment of polluted environments. *Bioresource Technology*, 214, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.010>
- LUM, Michael et al. Chemical Fate of Particulate Sulfur from Nighttime Oxidation of Thiophene. *ACS Es&t Air*, v. 1, n. 12, p. 1637-1649, 2024.
- MAGOWO, Webster Edzai; SHERIDAN, Craig; RUMBOLD, Karl. Global Co-occurrence of Acid Mine Drainage and Organic Rich Industrial and Domestic

Effluent: Biological sulfate reduction as a co-treatment-option. *Journal of Water Process Engineering*, v. 38, p. 101650, 2020.

MITRA, Saikat et al. Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University-Science*, v. 34, n. 3, p. 101865, 2022.

MORAN, Sean. *An applied guide to water and effluent treatment plant design*. Butterworth-Heinemann, 2018.

MOSQUERA-ROMERO, Suanny et al. Water treatment and reclamation by implementing electrochemical systems with constructed wetlands. *Environmental Science and Ecotechnology*, v. 16, p. 100265, 2023.

Parada, A. E., Needham, D. M., & Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environmental Microbiology*, 18(5), 1403– 1414. <http://doi.org/10.1111/1462-2920.13023>.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Rawat, A., Srivastava, A., Bhatnagar, A., & Gupta, A. K. (2023). Technological advancements for the treatment of steel industry wastewater: Effluent management and sustainable treatment strategies. *Journal of Cleaner Production*, 383, 135382. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.135382>

Rice, E. W. editor, Baird, R. B. editor/a, Eaton, A. D. editor/a, Clesceri, L. S. editor/a, & Bridgewater, L. editor/a. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington, DC American Public Health Association American Water Works Association Water Environment Federation.

Satoh, H., Oshima, K., & Araki, N. (2013). Role of Comamonas in microbial fuel cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(10), 4211-4218.

SHENG, Kuichuan et al. Effect of ammonia and nitrate on biogas production from food waste via anaerobic digestion. *Biosystems Engineering*, v. 116, n. 2, p. 205-212, 2013.

SHENG, Kuichuan et al. Effect of ammonia and nitrate on biogas production from food waste via anaerobic digestion. *Biosystems Engineering*, v. 116, n. 2, p. 205-212, 2013.

Sieber, J. R., McInerney, M. J., & Gunsalus, R. P. (2012). Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation. *Annual Review of Microbiology*, 66, 429-452.

Tezel, U., Tandukar, M., Hajaya, M. G., & Pavlostathis, S. G. (2014). Transition of municipal sludge anaerobic digestion from mesophilic to thermophilic and long-term performance evaluation. *Bioresource Technology*, 170, 385–394. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2014.08.007>

Tian, Z., Zhang, Y., Li, Y., Chi, Y., & Yang, M. (2015). Rapid establishment of thermophilic anaerobic microbial community during the one-step startup of thermophilic anaerobic digestion from a mesophilic digester. *Water Research*, 69, 9–19. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.11.001>

Torsvik, V., Øvreås, L., & Thingstad, T. F. (1990). Prokaryotic diversity—magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 296(5570), 1064-1066. <https://doi.org/10.1126/science.296.5570.1064>

Truong, M. V., Nguyen, L. N., Li, K., Fu, Q., Jhir, M. A. H., Fontana, A., & Nghiem, L. D. (2020). Biomethane production from anaerobic co-digestion and steel-making slag: A new waste-to-resource pathway. *Science of The Total Environment*, 738, 139764. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.139764>

Verein Deutscher Ingenieure (VDI). (2006). *Fermentação de Material Orgânico. Caracterização do Substrato, Amostragem, Coleta de Dados de Materiais, Testes de Fermentação*. Verein Deutscher Ingenieure. <https://www.vdi.de/en/home/vdi-standards/details/vdi-4630-fermentation-of-organic-materials-characterization-of-the-substrate-sampling-collection-of-material-data-fermentation-tests>

WANG, Shun et al. Inactivation of carbapenemase-producing Enterobacterales during anaerobic co-digestion of food waste and pig manure. *Bioresource Technology Reports*, v. 11, p. 100455, 2020.

WANG, Shun et al. Inactivation of carbapenemase-producing Enterobacterales during anaerobic co-digestion of food waste and pig manure. *Bioresource Technology Reports*, v. 11, p. 100455, 2020.

Yasim, N. S. E. M., & Buyong, F. (2023). Comparative of experimental and theoretical biochemical methane potential generated by municipal solid waste. *Environmental Advances*, 11, 100345. <https://doi.org/10.1016/J.ENVADV.2023.100345>

Zhang, W., Heaven, S., & Banks, C. J. (2017). Continuous operation of thermophilic food waste digestion with side-stream ammonia stripping.



Bioresource Technology, 244, 611–620.

<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.07.180>

Zhu, X., & Liu, X. (2019). Microbial communities and functional potentials in contaminated environments: perspectives for microbial remediation. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2150. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02150>

Zhu, X., Treu, L., Kougias, P. G., Campanaro, S., & Angelidaki, I. (2017). Characterization of the planktonic microbiome in upflow anaerobic sludge blanket reactors during adaptation of mesophilic methanogenic granules to thermophilic operational conditions. *Anaerobe*, 46, 69–77. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2016.12.015>