

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**EFEITO DA ADIÇÃO DE RÚMEN E DE ESTERCO
BOVINO NA COMPOSIÇÃO MICROBIANA DE
INÓCULO ANAERÓBIO, UTILIZADO PARA A
PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DO BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Nathália Vercelli de Assis

2021
Ouro Preto



EFEITO DA ADIÇÃO DE RÚMEN E DE ESTERCO BOVINO NA COMPOSIÇÃO MICROBIANA DE INÓCULO ANAERÓBIO, UTILIZADO PARA A PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia Industrial.

AUTORA: Nathália Vercelli de Assis

ORIENTADORA: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva

Ouro Preto

Dezembro de 2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

V481e Vercelli de Assis, Nathália.

Efeito da adição de rúmen e de esterco bovino na composição microbiana de inóculo anaeróbico, utilizado para a produção de biogás a partir do bagaço de cana-de-açúcar. [manuscrito] / Nathália Vercelli de Assis. - 2021.

105 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva.
Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial.

1. Digestão anaeróbia. 2. Bagaço de cana-de-açúcar. 3. Esterco bovino. 4. Rúmen bovino. 5. Esgoto sanitário. 6. Consórcio microbiano. 7. Biogás metano. 8. Metanogênese. I. de Queiroz Silva, Silvana. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 604

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Vercelli de Assis

Efeito da adição de rúmen e de esterco bovino na composição microbiana de inóculo anaeróbio, utilizado para a produção de biogás a partir do bagaço de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 01 de dezembro de 2021

Membros da banca

Doutora - Silvana de Queiroz Silva - Orientadora (Universidade Federal de Ouro Preto)

Doutora - Camila Carriao Machado Garcia - (Universidade Federal de Ouro Preto)

Doutor - Ênio Nazaré de Oliveira Junior - (Universidade Federal de São João del-Rei)

Silvana de Queiroz Silva, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 28/01/2022



Documento assinado eletronicamente por **Silvana de Queiroz Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/01/2022, às 08:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0273158** eo código CRC **62F6721C**.

DEDICAÇÃO

Dedico este trabalho ao meu filho Arthur Francisco. Esse serzinho lindo que escolheu vir como meu filho e que me tornou uma mulher mais forte e corajosa. Que você sempre tenha motivos para nunca desistir e acreditar em si mesmo meu pequeno. Que você cresça com o melhor caráter possível, sempre buscando a integridade, o respeito e amor com o próximo. Te amo para todo sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a espiritualidade por estar sempre presente em minha vida caminhando comigo, me levantando quando mais preciso e me permitindo ser forte cada dia mais. Existem momentos que só uma força invisível nos consegue levantar: o amor de Deus. Agradeço a minha família por todo apoio e carinho não só comigo, mas principalmente com meu filho. Em especial, agradeço imensamente e infinitamente todo apoio, amor e força dados por minha mãe e melhor amiga Nonata. Ela sempre fez e tem feito de tudo para que eu seja sempre feliz, incentivando e apoiando meus estudos, me trazendo toda força e apoio em todos os momentos da minha vida. Ela é a melhor mãe e agora, uma das melhores vovós do mundo.

Minha especial gratidão a minha orientadora e professora Silvana pela oportunidade, por sua empatia, constante compreensão e carinho durante essa fase de pandemia e minha maternidade. Por buscar em mim não só a produtividade, mas também enxergar o ser humano, dar valor e importância a minha saúde mental e emocional. Muito obrigada mesmo por todo apoio e compreensão.

Agradeço aos colegas de laboratório que convivi que tornavam os dias mais alegres e cheios de aprendizado. Agradeço as amizades formadas durante esse processo em especial, aos meus amigos do grupo das “gueixas” que trouxeram muita alegria e diversão para meus dias. Agradeço ao Tulio pelo apoio, amizade e incontáveis risadas. A amizade da Fernanda e dos amigos do intercâmbio Robert, Samuel, Meirielle, Carol e Débora que apesar de morarem longe, ainda estão presentes na minha vida.

Agradeço a UFOP, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ao NUPEB, ao LBTM, ao galpão da Química que proporcionaram a estrutura necessária a minha formação e pela oportunidade de ingresso. Aos colegas de pesquisa tanto do LBTM quanto de outros laboratórios pelo apoio. Agradeço ao financiamento da Capes pelo investimento na minha formação e desenvolvimento deste trabalho. A todos os técnicos, funcionários, docentes e discentes envolvidos. Agradeço ao secretário do programa Josino por sempre responder prontamente e eficientemente todas as minhas dúvidas desde o início. Meu muito obrigada a todos os professores dos programas por transmitirem conhecimento e aprendizado inspiradores. Agradeço a Fapemig (processo TEQ-APQ 035502-16) pelo apoio financeiro concedido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A busca por biotecnologias para produção de biogás a partir de fontes renováveis tem sido cada vez maior para garantir um futuro sustentável e redução dos gases do efeito estufa. Os gases metano e hidrogênio, gerados microbiologicamente durante a digestão anaeróbia, podem ser utilizados como biocombustíveis e na geração de energia elétrica e térmica. Uma alternativa para alcançar esse objetivo de interesse global é o uso de bagaço de cana-de-açúcar de segunda geração e esgoto sanitário na digestão. Entretanto, para obter maiores rendimentos nessa produção é importante compreender os micro-organismos no meio e suas funções metabólicas. Dessa forma, é necessário selecionar o melhor inóculo produtor de biogases e definir o consórcio microbiano responsável por tal produção. Neste estudo, foi comparado três diferentes consórcios microbianos de inóculos aplicados em amostras de esgoto sanitário retirado de um biorreator de fluxo ascendente de leito de lodo anaeróbico (UASB). Além disso também foi feita a comparação das funções metabólicas de cada micro-organismo identificado, atribuindo assim o papel microbiano no desempenho da produção de metano. Neste trabalho também foi avaliado a eficiência do tratamento térmico do inóculo, visando a eliminação de arqueias metanogênicas, para posterior produção de hidrogênio; e discutiu-se como esse tratamento afetou o consórcio microbiano nesse inóculo. Assim sendo os inóculos estudados foram nomeados como: UASB, contendo 100% de lodo proveniente de um tratamento anaeróbio de esgoto sanitário; UASB+FM, contendo 50% de lodo do esgoto sanitário e 50% de esterco bovino; UASB+R, contendo 50% de lodo do esgoto sanitário e 50% de rúmen bovino. Resultados prévios revelaram que o biorreator com maior produção de metano foi aquele inoculado com esterco bovino, UASB+FM. De acordo com a identificação microbiana, esse melhor desempenho deu-se devido a sintrofia entre as espécies microbianas *Clostridium disporicum*, *Methanobacterium kanagiense*, *Pseudomonas stutzeri*, *Anaerobaculum mobile*, *Anaerobaculum hydrogeniformans*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus acidicola*, *Soehngenia saccharolytica* e membros não identificados do gênero *Peptoclostridium*. Dentro desse consórcio microbiano se destaca os gêneros exclusivos desse biorreator: *Pseudomonas*, que é detoxificante e aumentou consideravelmente sua abundância no final da produção de metano; e *Bacillus*, com sua atividade degradadora de amido e celulose, que apesar da relativa baixa abundância, também aumentou consideravelmente no final do ensaio. Outro destaque se dá a espécie *Alcaligenes faecalis*, capaz de remover biogás metano do meio e está em menor abundância nessa amostra. Os micro-organismos que estavam ausentes ou pouco abundantes nos inóculos foram:

Aminobacterium, Asaccharospora, Bosea, Ensifer, Gemmobacter, Leucobacter, Leuconostoc, Methanoculleus, Mycobacterium, Oscillatoria, Paracoccus, Peptoclostridium, Pleomorphomonas, Pseudoclavibacter, Rhodoblastus, Rummeliibacillus, Sarcina, Shinella, Succiniclasticum, Treponema, Turicibacter e Weissela. Sendo assim, o consórcio do inóculo composto por lodo anaeróbio e esterco bovino proporcionou a melhor decomposição da biomassa lignocelulósica, potencial na degradação de inibidores e na geração de substratos para produção biogás metano. O tratamento térmico realizado no inóculo UASB+FM para produção de hidrogênio foi eficiente na remoção de arqueias como também de espécies que estavam abundantes no meio antes do tratamento: *Anaerobaculum, Peptoclostridium, Pseudomonas e Soehngenia*. Dentre os gêneros detectados após o tratamento foram: *Burkholderia* (mais abundante), *Rummeliibacillus, Sphingobium, Sphingomonas, Brevundimonas, Ruminofilibacter e Clostridium*. Somente o gênero *Clostridium* foi detectado antes e depois do tratamento, os outros foram detectados somente após o tratamento térmico. Os potenciais gêneros produtores de hidrogênio e detoxificantes nesse consórcio são *Burkholderia, Brevundimonas e Clostridium*.

PALAVRAS-CHAVE: digestão anaeróbia– bagaço de cana-de-açúcar-esterco bovino – rúmen bovino-esgoto sanitário- consórcio microbiano– biogás metano- metanogênese

ABSTRACT

The search for biotechnologies for biogas production from renewable sources has been growing in order to guarantee a sustainable future and to reduce greenhouse gases. Methane and hydrogen gases generated microbiologically during anaerobic digestion can be used as biofuels and in the generation of electrical and thermal energy. An alternative to achieve this goal of global interest is the use of second-generation sugarcane bagasse and sanitary sewage in the digestion. However, to obtain better yields on this production, it is important to understand microorganisms in the media and their metabolic functions. Thus, it is necessary to select the greatest biogas producer inoculum and to define the microbial consortium responsible for such production. In this study, it was compared three different microbial consortia from different inoculants added to sanitary sewage taken from an anaerobic sludge bed upflow bioreactor (UASB). In addition, the metabolic function effect of each identified microorganism was compared, assigning the microbial role on the methane production performance. In this work, it was also evaluated the efficiency of the thermal treatment on the inoculum aiming the elimination of methanogenic archaea for subsequent production of hydrogen; it was discussed how this treatment affected the microbial consortium from this bioreactor. Therefore, the samples were labeled as: UASB, containing 100% of sludge from an anaerobic treatment of sanitary sewage; UASB + FM, containing 50% of sludge of sanitary sewage and 50% cattle manure; UASB + BR, containing 50% sludge of sanitary sewage and 50% bovine rumen. Previous results revealed that the bioreactor with the highest methane production was the one enriched with bovine manure, UASB + FM. According to the microbial identification, such performance was due to the syntrophy between the microbial species *Clostridium disporicum*, *Methanobacterium kanagiense*, *Pseudomonas stutzeri*, *Anaerobaculum mobile*, *Anaerobaculum hydrogeniformans*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus acidicola*, *Soehngenia saccharolytica*, and members non-identified from the genera *Peptoclostridium*. Within this microbial consortium, the following exclusive genera from this bioreactor stood out: *Pseudomonas*, which is detoxifying and increases its abundance at the end of methane production; and *Bacillus* with its starch and cellulose degrading activity, which despite the relative low, also increased considerably at the end of the experiment. Another highlight is the species *Alcaligenes faecalis*, capable of removing biogas methane from the medium and it is in lower abundance in this sample. The microorganisms that were absent or not very abundant in the inocula were *Aminobacterium*, *Asaccharospora*, *Bosea*, *Ensifer*, *Gemmobacter*,

Leucobacter, *Leuconostoc*, *Methanoculleus*, *Mycobacterium*, *Oscillatoria*, *Paracoccus*, *Peptoclostridium*, *Pleomorphomonas*, *Pseudoclavibacter*, *Rhodoblastus*, *Rummeliibacillus*, *Sarcina*, *Shinella*, *Succiniclasticum*, *Treponema*, *Turicibacter*, and *Weissella*. Therefore, the inoculum consortia composed by anaerobic sludge and bovine manure provided the best decomposition of lignocellulosic biomass, potential for the degradation of inhibitors and the use of substrates generated for the production of methane biogas. The thermal treatment carried out in the inoculum UASB+FM for hydrogen production was efficient in removing archaea as well as species that were abundant in the environment before the treatment: *Anaerobaculum*, *Peptoclostridium*, *Pseudomonas*, and *Soehngenia*. Among the genera detected after treatment were: *Burkholderia* (most abundant), *Rummeliibacillus*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Ruminofilibacter*, and *Clostridium*. Only *Clostridium* genus was detected before and after treatment, the others were detected after. The potential hydrogen producers and detoxifying genera in this consortium were *Burkholderia*, *Brevundimonas* and *Clostridium*.

KEYWORDS: anaerobic digestion -- sugarcane bagasse- bovine manure - bovine rumen- sanitary sewage biogas methane- methanogenesis- microbial consortia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da lignocelulose	24
Figura 2: Desenho esquemático de um reator UASB	28
Figura 3: Hidrólise da celulose por ação sinérgica de enzimas	33
Figura 4: Gráfico comparativo da abundância percentual (maior que 1%) dos gêneros presentes nas amostras dos inóculos dos ensaios metanogênicos.....	47
Figura 5: Atividades metabólicas dos inóculos dos ensaios metanogênicos.....	48
Figura 6: Abundância relativa percentual dos gêneros (maior que 1%) identificadas nas amostras finais dos ensaios metanogênicos.	53
Figura 7: Atividades metabólicas das amostras finais dos ensaios metanogênicos.....	54
Figura 8: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no biorreator enriquecido com esterco bovino (UASB+FM)	58
Figura 9: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no biorreator enriquecido com rúmen bovino (UASB+R).	59
Figura 10: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no biorreator enriquecido somente com esgoto sanitário (UASB).....	60
Figura 11: Abundância relativa percentual dos gêneros identificados nos inóculos sem e com tratamento térmico para produção de biogás hidrogênio.	63
Figura 12: Atividades metabólicas relativas presentes nos inóculos sem e com tratamento térmico para o ensaio de hidrogênio.....	64
Figura 13: Abundância relativa percentual das espécies identificadas nos inóculos sem e com tratamento térmico para produção de biogás hidrogênio.	65
Figura 14: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no inóculo biorreator enriquecido com esterco bovino termicamente tratado para produção de biogás hidrogênio (inoc H2 UASB+FM)	64

Figura 15: <i>Heatmap</i> comparando as abundâncias relativas dos gêneros contidos nas amostras iniciais dos ensaios metanogênicos.	85
Figura 16: Abundância percentual das espécies (maior que 1%) presentes nas amostras dos inóculos dos ensaios metanogênicos.....	86
Figura 17: <i>Heatmap</i> comparando as abundâncias relativas dos gêneros detectados nas amostras finais dos ensaios metanogênicos.	88
Figura 18: Abundância percentual das espécies (maior que 1%) presentes nas amostras finais dos ensaios metanogênicos.....	89
Figura 19: <i>Heatmap</i> comparando as abundâncias relativas dos gêneros detectados nos inóculos enriquecidos com estrume bovino sem (inoc UAS+FM) e com tratamento térmico para produção de hidrogênio (inoc H ₂ UAS+FM)	90
Figura 20: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra inoc UASB. A barra representa gêneros com abundância relativa percentual a abaixo de 0,05%.....	94
Figura 21: : Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra meth UASB.....	95
Figura 22: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra inoc UASB+FM.....	96
Figura 23: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra meth UASB+FM.....	97
Figura 24: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra inoc UASB+R.	98
Figura 25: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra meth UASB+R.....	99
Figura 26: <i>Heatmap</i> apresentando as abundâncias relativas percentuais das amostras do ensaio metanogênico incluído o grupo “Outros”, que possuem abundância menor que 1%.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição lignocelulósica de alguns tipos de biomassa	28
Tabela 2: Produção acumulada de metano (NLCH ₄ /kg _{SV}) obtida na digestão anaeróbia do bagaço bruto sem pré-tratamento, com os três inóculos UASB (só esgoto), UASB BR(egoto e rúmen bovino) e UASB-FBM(egoto e esterco bovino)	44
Tabela 3: Presença ou Ausência das atividades dos Gêneros encontrados nos inóculos sem enriquecimento (inoc UASB), enriquecidos com esterco fresco bovino sem tratamento térmico (inoc UASB+FM), com rúmen bovino (inoc UASB+R) e das respectivas amostras retiradas no final dos ensaio metanogênicos (meth UASB, meth UASB+R, meth UASB+FM)	91
Tabela 4: Presença ou ausência das atividades dos gêneros encontrados nos inóculos enriquecidos com esterco fresco bovino sem tratamento térmico (inoc UASB+FM) e com tratamento térmico para redução de gêneros consumidores de hidrogênio (inoc H ₂ UASB+FM).....	92

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Biorefinarias.....	19
2.1.1 Perspectiva brasileira e mundial	20
2.2 Digestão Anaeróbia	23
2.2.1 Reator Anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo UASB.....	24
2.2.2 Inóculos	26
2.2.2.1 Rúmen bovino	26
2.2.2.2 Esterco bovino	27
2.2.2.3 Esgoto sanitário.....	27
2.2.3 Composição bagaço de cana	28
2.2.3.1 Celulose.....	29
2.2.3.2 Hemicelulose.....	30
2.2.3.3 Lignina	31
2.2.3.4 Pré-tratamento da lignocelulose Produtos de interesse	31
2.2.4 Atividades metabólicas.....	32
2.2.4.1 Hidrólise.....	32
2.2.4.2 Acidogênese	33
2.2.4.3 Acetogênese	32
2.2.4.4 Metanogênese	34
2.2.5 Inibidores da viabilidade microbiana	35
2.2.5.1 Amônia	36
2.2.5.2 Temperatura.....	36
2.2.5.3 pH	37
2.2.5.4 Hidrolisados lignocelulósicos	37
2.3 Metagenômica	38
3.0 OBJETIVOS	41
3.1 Geral	41
3.2 Específicos	41
4.0 METODOLOGIA	42
4.1 Metagenômica	43

4.1.1	Extração e quantificação de DNA	43
4.1.2	Sequenciamento de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA (bactérias).....	43
4.2	Análise e comparação de dados	44
5.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Comparação da comunidade microbiana dos inóculos e o efeito da sua composição na produção de metano	45
5.2	Comparação da comunidade microbiana ao final dos ensaios de produção de metano com os diferentes inóculos.	50
5.3	Comparação da comunidade microbiana dos gêneros com abundância relativa menor que 1 % no ensaio metanogênico (“Outros”).....	61
5.4	Comparação da comunidade microbiana do inóculos anaeróbico enriquecidos com esterco bovino, com e sem tratamento térmico, para produção de hidrogênio	62
6.0	CONCLUSAO	69
	REFERENCIAS.....	70
	APENDICE	84

1.0 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A dependência do uso de combustíveis fósseis gera riscos globais devido ao aumento dos níveis de gás carbônico na atmosfera, intensificando o aquecimento global. O debate sobre o aquecimento global e o previsível esgotamento de reservas fósseis levaram a iniciativa para o desenvolvimento de produção de energias renováveis (Miltner *et al.*, 2010; Mainardi *et al.*, 2020).

Com isso a busca por tecnologias para a produção de energia renováveis e sustentáveis tem crescido nas últimas décadas. No acordo assinado em Paris na COP21 em dezembro de 2015 foi determinado um objetivo global de limitar o aumento da média da temperatura global na superfície do planeta para abaixo de 2°C acima dos níveis industriais. De acordo com o relatório realizado pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas da ONU (IPCC) para manter o aumento da temperatura abaixo de 2°C com a probabilidade 66%, a quantidade de gás carbônico equivalente emitida não deve passar de 1000 gigatoneladas entre 2011 e 2100. De 2011 a 2019, cerca de 200 gigatoneladas já foram emitidos (Oliveira *et al.*, 2019). A produção de matéria prima para uma bioeconomia global terá de ser parte da gestão da paisagem e deve contribuir para manter os objetivos de desenvolvimento sustentável estabelecidos pela Assembleia Geral da União Europeia feita em 2015 juntamente com o acordo de Paris (Junginger *et al.*, 2019). Tais objetivos constam em garantir acesso a energia moderna, acessível, confiável e sustentável para todos (United Nations, 2021).

A geração de bioprodutos está aumentando e o mercado de biocombustíveis, bioquímicos, bioenergia e outros produtos derivados da biomassa pode ser notado. O uso otimizado da biomassa para produzir eletricidade, calor, combustíveis de transporte e materiais irá mudar juntamente com o aumento de ações em energias renováveis. Conseqüentemente, é fundamental para a indústria desenvolver e demonstrar um sistema integrado para biocombustíveis, bioprodutos e bioenergia que possa responder com agilidade ao mercado enquanto fornece benefícios sociais, ambientais e econômicos (Junginger *et al.*, 2019).

Uma biotecnologia promissora para converter essa realidade é a digestão anaeróbia (Ziganshin,2016). Nessa digestão, micro-organismos quebram e transformam substratos orgânicos complexos oriundos de resíduos e efluentes sanitário e/ou industriais (fontes de energia renováveis) em biogases (como metano e hidrogênio), substituindo assim os combustíveis fósseis de forma ecologicamente correta, 100% renovável e efetiva. Ela é amplamente utilizada no tratamento de resíduos agropecuários, industriais e sanitários.

Entretanto, existem desafios a serem superados tais como a compreensão das funções metabólicas dos micro-organismos na digestão de forma que se obtenha maior rendimento de biogases (Mainardi *et al.*, 2020).

Os biogases metano e hidrogênio produzidos na digestão anaeróbia podem ser utilizados para gerar calor e eletricidade para casa e indústrias e também como biocombustíveis para automóveis. A substituição destes gera mudança na infraestrutura energética e nas tecnologias de produção e utilização. Mas essa troca será somente válida se os biogases forem produzidos de forma sustentável, ou seja, baseado na transformação de matérias primas renováveis e energias renováveis e com tecnologias de conversão eficientes de acordo com a escala apropriada (Miltner *et al.*, 2010; Monlau *et al.*, 2013).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas e possui uma vasta produção de plantações de cana-de-açúcar, que é principal matéria prima para produção de etanol e que paralelamente gera uma vasta quantidade de bagaço de cana (Oliveira *et al.*, 2019). Pelo fato de possuir larga produção de cana de açúcar, muitos esforços têm sido feitos para trazer um potencial econômico para esse tipo de biomassa que é uma fonte de energia renovável de forma a manter o uso sustentável em biorrefinarias (Júnior, 2017; Junginger *et al.*, 2019). Além disso, existe a possibilidade do uso dessa biomassa para gerar bioeletricidade para ser utilizada na mesma planta de energia da biorrefinarias (Carpio e Souza, 2019). Logo a biomassa vai continuar tendo seu papel importante como matéria prima para geração de energia renovável (Junginger *et al.*, 2019). Porém o pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma das fases mais importantes e caras nas biorrefinarias de bioetanol. Para o uso do bagaço de cana é necessário um pré-tratamento alcalino de alto e biológico de longa duração. Esses fatores limitam as aplicações do bioetanol 2G (Junqueira *et al.*, 2017; Jensen *et al.*, 2018; Carpio e Souza, 2019).

O uso do bagaço de cana gerado na produção de etanol de 1G, leva a produção de um bagaço de 2G, que ainda pode ser processado durante uma digestão anaeróbica produzindo biogases metano e hidrogênio. Essa digestão anaeróbia pode ser inoculada com micro-organismos contidos num meio onde é detectada a produção dos biogases metano e hidrogênio. A partir daí que inóculos como esgoto sanitário, esterco e rúmen bovino entram como potenciais fontes de enriquecimento microbiano para produção de biometano e biohidrogênio (Lima, 2018).

A capacidade de degradação da lignocelulose por micro-organismos presentes nos inóculos propicia a disponibilidade de açúcares para serem utilizados como substratos para as etapas necessárias para produção de biogás. O uso de esgoto sanitário fortalece o meio disponibilizando nutrientes como proteínas, ácidos nucleicos, ureia, amônia, nitrato, nitrito, e fontes de carbono (açúcares redutores e não redutores) (Brar *et al.*, 2020). Os nutrientes e micro-organismos do esgoto podem ser retirados e selecionados para uso em outros tratamentos como a digestão anaeróbica aumentando a produção de hidrogênio (Prakash *et al.*, 2018; LaMartina *et al.*, 2021). Alguns gêneros de bactérias comumente encontradas no esgoto sanitário *Acinetobacter*, *Arcobacter*, *Cloacibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactococcus* (LaMartina *et al.*, 2021).

O rúmen bovino é amplamente conhecido por conter micro-organismos com enzimas capazes de degradar a lignocelulose, proteínas, dextrinas, amido e de utilizar glicerol, lactato e hidrogênio. produtos finais da fermentação tais como acetato, formiato, propionato e butirato são comumente acumulados no rúmen e posteriormente utilizados pelo animal como fonte de energia. Os gases gerados no rúmen, hidrogênio, dióxido de carbono e metano, são eliminados para o meio externo. Alguns micro-organismos responsáveis por essas transformações da matéria orgânica no rúmen são os gêneros *Clostridium*, *Bacteroides*, *Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*, *Ruminococcus*, *Streptococcus* e *Succinimonas* (Russel *et al.*, 1981).

O esterco bovino possui similaridades com o rúmen bovino no que tange a capacidade de degradar a lignocelulose e possuir arqueias produtoras de metano. Ele também é composto por materiais lignocelulósicos e tem como produtos de fermentação os ácidos acéticos, butíricos e propiônico (Li *et al.*, 2020). Alguns gêneros que já foram encontrados em esterco bovino foram *Methanosarcina*, *Methanobacterium*, *Methanosaeta*, *Methanobrevibacter*, *Ruminofilibacter*, *Sedimentibacter* (Dong *et al.*, 2019).

Para identificar e posteriormente compreender as atividades metabólicas de cada micro-organismo existente no meio de cultivo da digestão anaeróbia, faz-se o uso da metagenômica. A metagenômica faz a extração, quantificação e sequenciamento de DNA dos micro-organismos presentes em uma amostra. Essa técnica foi utilizada nesse trabalho para identificar e comparar as arqueias e bactérias estavam presentes nas amostras enriquecidas com diferentes inóculos e verificar a eficiência do tratamento térmico na eliminação de arqueias consumidoras de hidrogênio. Uma vez identificados, o estudo e análise das principais funções metabólicas dos micro-organismos se torna possível. Logo, o uso da metagenômica possibilita

compreender quais os micro-organismos influenciam nas principais conversões em produtos biotecnológicos de interesse, como o biometano e biohidrogênio.

Sendo assim, ao realizar a digestão anaeróbia do bagaço de cana-de-açúcar sem a etapa de pré-tratamento e utilizando da metagenômica para determinar os principais micro-organismos que são mais eficientes na produção de biogases possibilitará um bioprocessamento mais barato (remoção da etapa mais cara do processo) e sustentável além de reduzir a emissão de gases do efeito estufa na atmosfera.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biorrefinarias

A biorrefinaria baseada na cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) como matéria-prima pode integrar no mesmo espaço físico, de processos para obter biocombustíveis (etanol), compostos químicos (de açúcar ou etanol), eletricidade e calor (Júnior, 2017). O uso da cana-de-açúcar como matéria prima é desejável devido ao seu potencial para fornecer os seguintes compostos e materiais: açúcares: sacarose (caldo), glicose (derivada da conversão da celulose e sacarose), e xilose (derivada da hemicelulose); etanol: da fermentação da sacarose; polímeros naturais ou macromoléculas: celulose, hemicelulose e lignina presentes no bagaço e palha (biomassa lignocelulósica) que podem ser convertidas em fontes de hexose, pentose e fenol respectivamente; vinhaça ou água residual rica em matéria orgânica; outros compostos como álcoois e dióxido de carbono de alta pureza para uso para alimentos e químicos (Júnior, 2017).

O desenvolvimento de bioetanol de segunda geração(2G) especialmente combinado com indústrias de bioetanol de primeira geração, é uma opção atraente pois ela pode utilizar equipamentos e sistemas de fornecimento de energia como biorreatores para fermentação e colunas de destilação. O fato do bagaço de cana já estar disponível no local, o custo da logística diminui. Além disso, uma vez que somente cerca de um terço do bagaço disponível é exigido para produzir a energia necessária para o processo de bioetanol de primeira geração, a integração do processo de segunda geração é estimado aumentar 40% do total da produção de etanol. A produção integrada de bioetanol 1G e 2G é mais vantajosa e economicamente mais viável do que a produção individual de bioetanol 1G (Jensen *et al*, 2018; Carpio e Souza, 2019).

O uso da biomassa lignocelulósica inteira, ou seja, o bagaço, palha e os topos podem significativamente aumentar a produção de bioetanol de 2G quando comparados ao uso somente do bagaço. Considerando que não há colheita da cana-de-açúcar nos meses com chuva, as plantas de bioetanol de 1G normalmente operam durante cerca de 8 a 10 meses por ano, Entretanto tecnologias que permitem o estoque do bagaço são uma forma atraente de integrar biorrefinarias de 1G e 2G. A utilização de outras plantações durante os meses sem operação é uma alternativa porém exige maiores logísticas e adaptação de processos no caso da produção de bioetanol derivado de milho (Jensen *et al*, 2018).

De acordo com Kucharska *et al* (2018), a biorrefinaria é a junção estratégica da produção de biocombustíveis juntamente com a geração de energia e produção de químicos valiosos a partir de materiais lignocelulósicos. Aproximadamente 48% dessa biomassa vem do

processamento de materiais lignocelulósicos. Os pré-tratamentos por serem de alto custo, são focados não somente no aprimoramento da produção de biocombustíveis mas também na produção e posterior separação dos úteis bioprodutos gerados. O fracionamento da biomassa em seus subcomponentes continua sendo a maior dificuldade (Kucharska *et al.*, 2018)

O pré-tratamento é uma das fases mais importantes e caras nas biorrefinarias de bioetanol derivado de lignocelulose. Para o uso do bagaço de cana é necessário um pré-tratamento alcalino ou ácido de alto custo e biológico de longa duração. Esses fatores limitam as aplicações do bioetanol 2G (Junqueira *et al.*, 2017; Jensen *et al.*, 2018; Carpio e Souza, 2019).

O processamento hidrotérmico tem sido considerado um pré-tratamento ecologicamente correto e de custo efetivo pois não exige a adição e recuperação de compostos químicos; tem equipamentos com problemas de corrosão limitados; e tem operação simples e econômica. O bagaço de cana-de-açúcar tem um conteúdo de matéria seca de cerca de 50% do valor ideal para o pré-tratamento hidrotérmico. Logo o estoque de biomassa seca não seria necessário e vantajoso, como o processo de secagem não só aumentaria os custos mas também aumentar a recalitrância da biomassa. Por outro lado, devido a umidade natural do bagaço durante o estoque pode estragar devido a deterioração por micro-organismos e reduzir a disponibilidade dos açúcares necessários a fermentação que gera os produtos de interesse como o bioetanol (Jensen *et al.*, 2018).

2.1.1 Perspectiva brasileira e mundial

No Brasil a produção de etanol de primeira geração (1G) iniciou devido a criação do programa PROALCOOL em 1970. Atualmente é um processo de grande escala bem estabelecido com reduções no custo de produção ao longo dos anos devido ao ganho nos campos industriais e de agricultura e ao aumento na escala produção (Junqueira *et al.*, 2017).

De acordo com o comprometimento feito pelo Brasil dentro da sua Contribuição das Intenções Determinadas Nacionalmente (INDC) a COP21 ocorrida em Paris em 2015 para reduzir a emissão dos gases do efeito estufa está o aumento das ações de biocombustíveis sustentáveis na matriz energética brasileira (Junqueira *et al.*, 2017).

O Brasil possui vantagens climáticas e grande quantidade de terras disponíveis para cultivar cana de açúcar. Isso leva a ser um dos maiores produtores da agricultura do mundo, o

segundo maior produtor de etanol e juntamente com os EUA, possuir o menor custo de produção de etanol (Oliveira *et al.*, 2021). A cana-de-açúcar no Brasil é praticamente a única fonte de matéria prima para açúcar (sacarose) e seus derivados já nos EUA, a maioria da fonte de açúcar é milho (Júnior, 2017).

Tendo em vista que o milho é fonte de alimentação básica, a competição entre a produção de bioetanol e da produção de alimento por essas mesmas fonte pode elevar o seu preço, causando uma certa escassez não só nos EUA mas também nos países que o exportam. Já no Brasil não gera essa ameaça a alimentação mundial pois o uso dele é dividido entre a produção de açúcar e de etanol de primeira geração (1G). Entretanto há limitações no uso de terras. Felizmente isso pode ser resolvido ao utilizar o bagaço lignocelulósico da cana-de-açúcar para produzir etanol de segunda geração (2G) aumentando a produção de etanol total das biorrefinarias sem afetar o uso das terras (Carpio e Souza, 2019).

O etanol 2G nos EUA é regido por políticas e incentivos como o Padrão de Combustível Renovável (RFS) onde é estimulado o consumo. Já no Brasil o incentivo fica mais direcionado para pesquisa e desenvolvimento para conversão da biomassa e para a construção de plantas de etanol 2G dentro da iniciativa PAISS (suporte de inovação tecnológica industrial nos setores químicos e de bioenergia) (Junqueira *et al.*, 2017; FINEP, 2021).

O desenvolvimento econômico de sistemas diferentes de biomassa é parte da agenda de Pesquisa e Desenvolvimento e Inovação de países desenvolvido e em desenvolvimento como Alemanha, França, EUA, Brasil e Coréia do Sul dentre outros, mobilizando grandes quantidades de esforços e fontes públicas e privadas e almejando o uso otimizado de biomassa. É uma tendência que procura adicionar valor nas cadeias produtivas e para reduzir o impacto ambiental negativo (Júnior, 2017).

A Europa estabeleceu em dezembro de 2017 um registro de gás renovável chamado ERGaR (*European Renewable Gas Registry*), que funciona baseado na cooperação com registros dos biogases nacionais. Até 2019 esse registro cobria 10 países europeus e traz conjuntamente a especialidade de estabelecer uma documentação confiável, transparente independente para transferência internacional e balanço de massa de gases renováveis injetados dentro da rede Europeia de gás natural. Biometano é considerado gás natural e pode ser distribuído para o consumidor via a rede já existente de gás natural, na qual é disponível em muitos países. O número de plantas de biometano tem aumentado significativamente, sendo que a Europa está na liderança, com 459 plantas e produzindo 1,2 bilhões de metros cúbicos anualmente.com um aumento por um fator de 17 só entre os anos de 2011 até 2019. A maioria

das plantas foram construídas na Alemanha, Reino Unido e Suécia. Até 2019 o comércio de biometano utilizando a rede de gás natural tem sido realizada somente em pequenas quantidades e entre países vizinho na Europa como Alemanha e Suíça , Holanda e Suécia. (Junginger *et al.*, 2019).

De acordo com o cenário feito por Oliveira *et al* (2021) utilizando um modelo de avaliação integrado baseado no sistema brasileiro de uso do solo e energia, em 2050 o surgimento de biorrefinarias baseadas em biomassa e bioenergia reduzirá as taxas de produção e combustão de petróleo refinado, levando a concomitante redução dos gases do efeito estufa. Esse modelo indica a biomassa como principal portadora de energia para reduzir os gases do efeito estufa no sistema de energia global. O resultado desse modelo também concluiu por meio do modelo que em 2050, produtos petroquímicos de base biológica corresponderão por 33% do total da produção petroquímica em um cenário rigoroso de atenuação de dióxido de carbono. Além disso, em 2040 mobilidade pela eletricidade levaria ao reaproveitamento do etanol para a produção de materiais compensando a perda de mercado de combustível.

2.1.2 Produção de biogás metano e hidrogênio

Os gases metano e hidrogênio são utilizados normalmente para a geração de calor, eletricidade e transporte de combustível (Wainaina *et al.*, 2020). Ambos são fontes de energias que atendem a 10% do objetivo de combustível renovável da União Européia para transporte doméstico (Byrne *et al.*, 2018).

Pesquisas para a produção de ambos os gases é motivada para uso para geração de eletricidade e síntese química, como a produção de amônia e hidrogenação de gorduras. Outras vantagens da digestão anaeróbia que produz esses gases é que o biodigestatos são amplamente utilizados com biofertilizantes na agricultura (Byrne *et al.*, 2018).

O biogás metano pode ser produzido a partir de resíduo orgânico e pode ser convertido em outros combustíveis utilizando processos com baixo impacto ambiental (Byrne *et al.*, 2018). A concentração do metano atmosférico, um gás potente do efeito estufa, tem aumentando fortemente desde a era pré industrial. Foi estimado que 10 a 20% de toda matéria orgânica reativa enterrada nos sedimentos é convertida a metano. Para oceanos, isso é estimado a ser 85 a 300 teragramas de metano por ano. Lagos e reservas são fontes de metano e são consideradas importantes para o orçamento global de metano. A produção de metano e lagos rasos podem aumentar devido ao aumento das temperaturas do ar e da água por causa do aquecimento global.

Emissões de metano são fortemente limitadas por oxidações tanto aeróbicas quanto anaeróbicas (Grinsven *et al.*, 2020).

Hidrogênio é um substrato elementar em vários processos químicos e petroquímicos como a síntese de anilina a partir de nitrobenzeno, a produção de gás sintético, hidrogenação de olefinas, síntese de amônia, etano, metanol, plásticos, circuitos integrados e fibras óticas. O potencial energético do hidrogênio é maior do que qualquer outra fonte de energia química ou biológica e é considerado promissor pois sua combustão produz zero emissão de carbono (Byrne *et al.*, 2018; Kucharska *et al.*, 2018). A produção de hidrogênio pode ser feita por reforma de vapor de metano, deslocamento de gás de água, gaseificação de carvão e coque e reforma de hidrocarbonetos originados do petróleo bruto por gás de água. A eletrólise da água é outro método de geração de hidrogênio. No entanto, isso requer um alto consumo de energia elétrica (Kucharska *et al.*, 2018). Entretanto, a produção de hidrogênio por eletrólise pode ser considerada uma tecnologia renovável se a eletricidade é usada para a operação do eletrolisador (Miltner *et al.*, 2010).

Tecnologias de produção de hidrogênio a partir da biomassa estão em desenvolvimento, consequentemente somente algumas plantas e dados de operação estão disponíveis atualmente. Logo existe uma dificuldade na identificação de tecnologias promissoras como também das vantagens e desvantagens de cada tecnologia. Portanto, é importante pesquisar líquidos derivados de biomassa e métodos de conversão de biomassa microbiana que possam ser usados em escala industrial (Kucharska *et al.*, 2018; Miltner *et al.*, 2010). A simulação de processo fornece a possibilidade de construir perfis de plantas teóricos baseados nos dados do processo real que poderia ser retirado de experimento de escala laboratorial. Além disso os resultados dessa simulação traz a avaliação das diferentes tecnologias e identificação de obstáculos e potenciais (Miltner *et al.*, 2010).

2.2 Digestão Anaeróbia

Digestão anaeróbica é amplamente utilizada para tratamento de resíduos líquidos para a produção de biogás renovável, principalmente metano. É aplicável a vários materiais orgânicos a 35-60 graus Celsius (Suzuki *et al.*, 2015). Esse processo tem sido revelado como tecnologia verde eficiente em tratar esgoto, esterco animal, resíduos da agricultura e de alimentos (Chen *et al.*, 2008; Zang *et al.*, 2013; Mainardis *et al.*, 2020).

Eles são produzidos pela a atividade de um consórcio microbiano complexo abrangendo diferentes grupos funcionais de bactérias e arqueias que convertem compostos orgânicos de alto peso molecular em metano. Essa conversão da matéria orgânica a biogás inclui 4 estágios: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese (Koupaie *et al.*, 2019).

A comunidade bacteriana converte os compostos orgânica a ácidos orgânicos, álcoois, hidrogênio e dióxido de carbono, enquanto alguns micro-organismos metanogênicos do domínio *Archaea* produzem metano utilizando rotas acetoclásticas, hidrogenotróficas e metilotróficas. A relação sintrófica entre bactérias que oxidam ácidos orgânicos e álcoois e arqueias metanogênicas é essencial para o processo de digestão anaeróbia (Ziganshin *et al.*, 2016; Koupaie *et al.*, 2019).

Dentre vários micro-organismos envolvidos na produção de biogás, as metanogênicas são muito sensíveis a fatores ambientais, como amônia, sulfeto e concentrações de ácidos orgânicos, levando a deficiências no processo. Portanto uma compreensão detalhada do consórcio de micro-organismos nos reatores de biogás é de fundamental importância para desenvolver e melhorar os processos de digestão anaeróbica (Ziganshin *et al.*, 2016).

A aplicação do pré-tratamento apropriado antes da digestão anaeróbica ou a criação de uma mistura complementar de substrato pode aumentar significativamente a eficiência da fermentação e conseqüentemente o rendimento do biogás metano. As plantas de digestão anaeróbia para produção de biometano podem ser feita de grande e pequena escala caso os substratos tiverem potencial de metano adequado que é normalmente avaliado pelo potencial bioquímico de metano (BMP) (Mainardis *et al.*, 2020).

Digestores aeróbicos de alta taxa tem alta capacidade de carga e baixa produção de lodo. Além disso, separam a retenção da biomassa da retenção líquida reduzindo assim o volume exigido do reator (Mainardis *et al.*, 2020).

2.2.1 Reator Anaeróbio de fluxo ascendente de manta de lodo (UASB)

Criado nos anos 1970 na Holanda, o reator de manta de lodo anaeróbico de fluxo ascendente ou UASB é o mais amplamente utilizado no mundo (Figura 1). Sua aplicação aumentou rapidamente devido a sua performance excelente em diferentes correntes de efluentes biodegradáveis. A principal característica deste reator é o lodo granular que retém a biomassa altamente ativa com configurações excelentes no reator, mostrando um índice de volume de

lodo muito baixo e conseqüentemente uma melhor separação do efluente (Tawfik *et al.*, 2010; Mainardis *et al.*, 2020).

Esse reator tem capacidade de tratar vários tipos de resíduos e efluentes industriais com alta concentração da demanda química de oxigênio (DQO) e alta taxa bioquímica de demanda de oxigênio (DBO) por demanda química de oxigênio (DBO/DQO) em até mesmo em temperaturas ambiente operacionais. Alguns exemplos são efluentes de cervejarias, vinhaça de cana-de-açúcar, de fábricas de papel, de laticínios, de esgotos sanitários (Mainardis *et al.*, 2020).

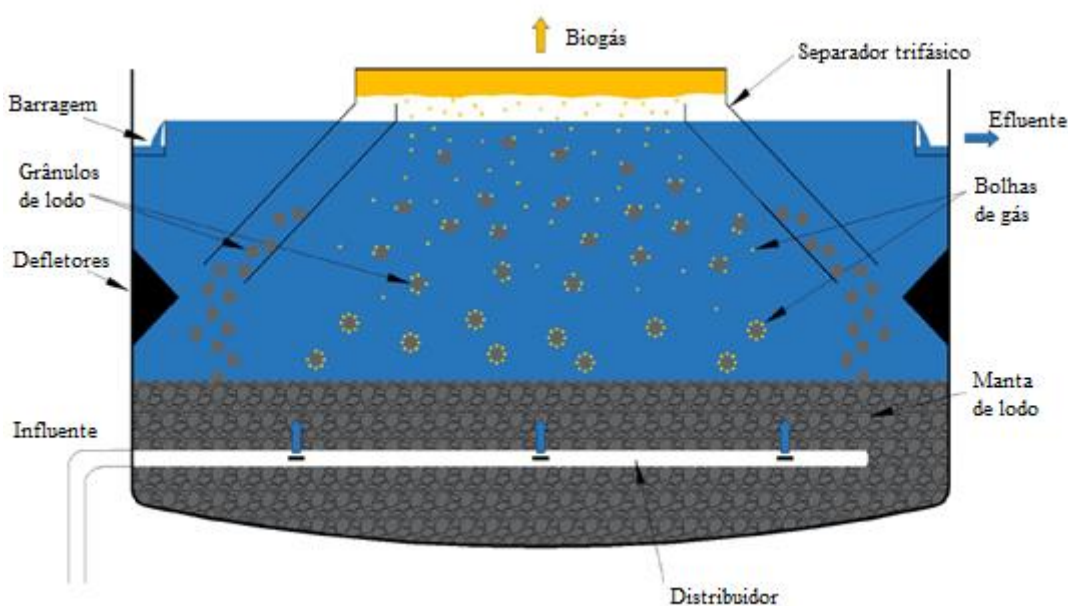


Figura 1: Desenho esquemático de um reator UASB (adaptado de Mainardi *et al.*, 2020).

O mecanismo de funcionamento de um reator UASB ocorre inicialmente com o efluente líquido entrando na base do reator e em seguida sendo direcionada ao topo por meio de uma manta de lodo granular misturando eficientemente o efluente líquido e a biomassa gerando assim uma rápida decomposição anaeróbica. Depois com o fluxo vertical do efluente líquido através manta lodo granular repetidas vezes faz com que a manta se expanda ao mesmo tempo que os micro-organismos contidos no lodo remova os poluentes contidos no efluente líquido. Vale ressaltar que a qualidade do biofilme e a intimidade manta-efluente líquido são um dos fatores responsáveis s pela eficiência deste reator. Com o tempo ocorre a produção de biogás dentro do reator que aumenta o contato entre o lodo e o efluente líquido. E um separador trifásico (gás-líquido-sólido) localizado no topo do reator extrai o biogás e o separa do efluente líquido e das partículas do lodo residual.

A proporção geométrica e operacional típica de um reator UASB é de razão de altura para diâmetro de 0,2 a 0,5 metros com velocidade de fluxo ascendente de 0,5 a 1 metro por hora e inoculação de 10 a 30 por cento do volume total do reator (Mainardis *et al.*, 2020).

2.2.2 Inóculos

Inóculos são as principais fontes de micro-organismos que fazem todo o processo de transformação da lignocelulose em ácidos, álcoois e gases de interesse industrial (metano e hidrogênio) no processo de digestão anaeróbica. Logo, a escolha do tipo inóculo deve ser direcionada para fontes que contenham micro-organismos capazes de produzir não só diretamente hidrogênio e metano mas também os que fazem as transformações necessárias para chegar nos biogases com produtos finais (hidrólise, acidogênese e acetogênese). Tendo em vista isso, a sintrofia de micro-organismos presentes em um ou mais inóculos é essencial para que determinar o melhor rendimento de produção de biometano e biohidrogênio (Brar *et al.*, 2020).

Além disso, a composição e variedade de inóculos propicia não só os tipos de micro-organismos para a digestão anaeróbia, mas também a nutrição dos mesmos facilitando o autotrofismo (Brar *et al.*, 2020).

2.2.2.1 Rúmen Bovino

Os micro-organismos presentes no rúmen possuem enzimas especializadas para sua degradação da biomassa lignocelulósica. Por este fato o rúmen tem sido utilizado como inóculo para digestão anaeróbica (Ozbyram *et al.*, 2018).

A principal função da microbiota do rúmen é a hidrólise e fermentação dos polímeros de plantas, resultando na formação de ácidos graxos de cadeia curta e gás carbônico e hidrogênio. Os ácidos graxos são consumidos pelos ruminantes, e as arqueias metanogênicas usam o gás carbônico e hidrogênio para produzir metano. A degradação dos compostos celulósicos ocorre no intestino grosso e no cólon anterior dos ruminantes. O digestato passa pelo intestino grosso onde é absorve água e os restos excretados. Logo a comunidade microbiana do esterco está diretamente ligada com a microbioma do intestino grosso e algumas partes do trato gastrointestinal do ruminante. O metano é principalmente produzido no rúmen e apenas cerca 11% é formado na parte baixa do sistema digestivo (Ozbyram *et al.*, 2018).

A microbiota do rúmen inclui principalmente micro-organismos metanogênicos que utilizam hidrogênio e gás carbônico para produzir metano. As famílias *Prevotellaceae* e

Fibrobacteraceae são degradadores de celulose (Ozbyram *et al.*, 2018). Algumas espécies celulolíticas e hemicelulolíticas presentes no rúmen são *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Prevotella ruminicola*, *Ruminococcus albus*; os gêneros *Butyrivibrio*, *Prevotella* e *Pseudobutyrvibrio* (Baba *et al.*, 2019).

2.2.2.2 Esterco bovino

Uma fonte rica e diversa de micro-organismos para produção de metano é o esterco bovino que se adapta a mudanças operacionais (Schumacher *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2014).

Uma das principais características do esterco bovino são o alto conteúdo de umidade e cinzas; mais de 50% de componentes lignocelulósicos devido a alimentação do animal; metais alcalinos que tem potencial de tampão; e os micro-organismos fermentativos e metanogênicos (Li *et al.*, 2021).

O uso de esterco bovino aumenta a disponibilidade de carbono orgânico no meio e facilita a produção de metano. Algumas famílias metanogênicas encontradas em esterco bovino são *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanocellaceae* e *Methanosarcinaceae* (Kim *et al.*, 2014). E em simbiose com as metanogênicas também encontram-se as bactérias hidrolíticas ou fermentadoras *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae* e *Clostridiales* (Ozbyram *et al.*, 2018). Por exemplo, a bioaugmentação feita com *Clostridium thermocellum* em uma biomassa lignocelulósica levou ao aumento do rendimento de metano em 39% (Arelli *et al.*, 2021).

2.2.2.3 Lodo proveniente do tratamento biológico de esgoto sanitário

O uso de esgoto sanitário fortalece o meio disponibilizando nutrientes como proteínas, ácidos nucleicos, ureia, amônia, nitrato, nitrito, e fontes de carbono (açúcares redutores e não redutores). Tudo isso possibilita o autotrofismo (Brar *et al.*, 2020).

Esgoto sanitário ou urbano é composto por diversas fontes água de chuva, esgoto industrial e residencial. Os nutrientes e micro-organismos do esgoto podem ser retirados e selecionados para uso em outros tratamentos como a digestão anaeróbica (LaMartina *et al.*, 2021). No caso da digestão anaeróbica, uma variedade de esgotos tem sido utilizados como substratos para aumentar a produção de hidrogênio (Prakash *et al.*, 2018). A biorremediação também é estimulada por meio do uso de esgoto sanitário como inóculo e fonte nutritiva para digestão anaeróbica (Brar *et al.*, 2020).

Alguns gêneros de bactérias comumente encontradas no esgoto sanitário *Acinetobacter*, *Arcobacter*, *Cloacibacterium*, *Flavobacterium*, *Lactococcus* (LaMartina *et al.*, 2021).

2.2.3 Composição do Bagaço de Cana

A lignocelulose é o componente básico de plantas e é explorado por vários tipos de indústrias como farmacêutica, de alimentos e cosmética. Alguns exemplos de materiais lignocelulósicos além do bagaço de cana são: gramas, árvores, troncos e flores; resíduos de indústrias de serraria e papel; palha de cereais e de milho; espiga do milho; caule de batata; partes de beterraba ; e resíduos da prensagem de óleos de girassóis e de canola (Kucharska *et al.*, 2018; Soni *et al.*, 2018).

O bagaço de cana tanto de primeira geração e segunda geração (1G e 2G) é composto por biomassa lignocelulósica, ou seja, por lignocelulose, que tem a seguinte composição média de massa: celulose 41,7% do peso total; hemicelulose 34% do peso total; lignina 12.6% do peso total (Koupaie *et al.*, 2019; Júnior, 2017).

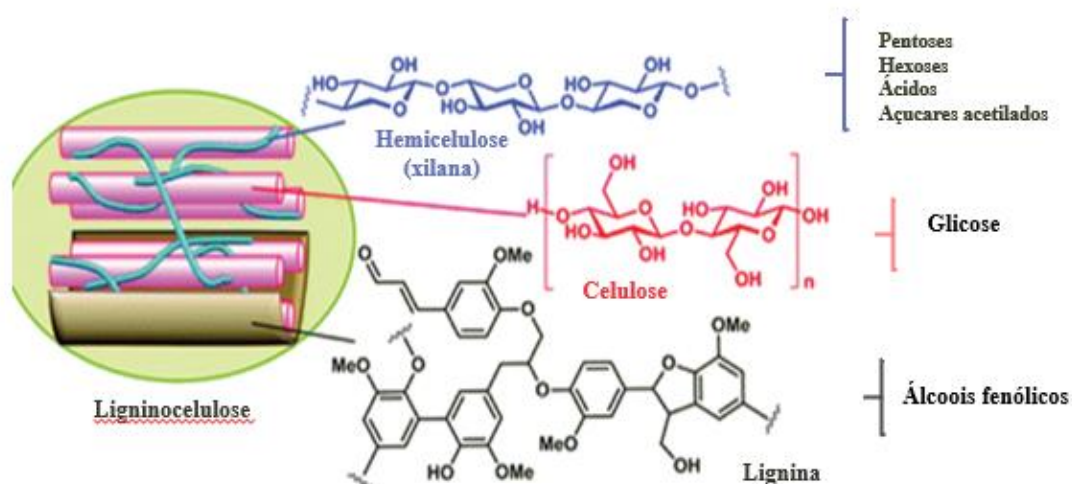


Figura 2: Estrutura da lignocelulose (adaptado de Abo *et al.*, 2019).

A tabela a seguir mostra os principais componentes na biomassa lignocelulósica de alguns materiais.

Tabela 1: Composição lignocelulósica de alguns tipos de biomassa (adaptado de Koupaie *et al.*, 2019).

Fonte	Tipo de biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose(%)	Lignina (%)
Municipal	Jornal	40-55	25-40	18-30
	Papel	85-99	0	0-15

Agricultura	Bagaço de cana	38,2	27,1	20,2
	Esterco bovino	20	1,6-4,7	1,3-3,3
	Espiga de milho	45	35	15
	Palha de arroz	32	24	13-18
	Cana-de-açúcar	25	17	12
	Palha de trigo	29-35	26-32	16-21
Floresta	Gramma	25-40	35-50	10-30
	Folhas	15-20	80-85	0
	Tronco de madeira	45-50	25-35	25-35

2.2.3.1 Celulose

A celulose está na parede celular primárias da maioria das plantas, variando em sua composição nas mesmas, por exemplo, 90% da composição do algodão e 60% na madeira. Por isso é amplamente conhecida nas indústrias têxteis e de papel (Wang e Tang,2019).

Do ponto de vista estrutural, a celulose é um biopolímero de estrutura cristalina não ramificado composta por monômeros de glicose conectados por ligações β -1,4-glicosídicas. É também um polissacarídeo linear que é insolúvel em água e hidrofílico. Para sua quebra é necessária a ação das enzimas: endoglucanase, que hidrolisa as ligações internas β -1,4-glicosídicas; exoglucanase que hidrolisa as ligações externas, removendo os dímeros e monômeros do final da cadeia de glicose; e glicosidase que hidrolisa os dímeros de glicose (Kucharska *et al.*, 2018; Soni *et al.*, 2018).

A degradação da celulose é considerada difícil devido a alta estabilidade e revestimento polissacarídeo das microfibras de celulose. Em ambientes fisiológicos não ocorre sua degradação por falta de enzimas apropriadas para romper a ligação beta acetal. Entretanto, a hidrólise enzimática pode ser assistida por soluções de ácidos concentrados em alta temperatura, sua estrutura quiral se modifica e libera unidades de glicose (Kucharska *et al.*, 2018, Soni *et al.*,2018).

Além das plantas, a celulose também pode ser encontrada em micro-organismos como fungos, bactérias e algas (Wang e Tang, 2019; Soni *et al.*, 2018). Sendo *Acetobacter xylinum* a primeira bactéria ser reportada a produzir celulose em 1886. Atualmente, dentro desse mesmo

gênero, sabe-se das espécies *Acetobacter hansenii* e *Acetobacter pasteurianus* que devido a sua alta produtividade de celulose já são utilizadas comercialmente. Outros gêneros conhecidos por produzir celulose são: *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes* e *Sarcina ventriculi* (Wang e Tang, 2019).

2.2.3.2 Hemicelulose

Hemicelulose é um heteropolímero ramificado composto por hexoses: D-galactose, L-galactose, D-manose e L-frutose; pentoses: L-ramnose, arabinose e xilose; ácido D-glucurônico; baçúcares acetilados.

A composição da hemicelulose depende do tipo de planta, lugar de cultivo e estação. Por exemplo, a xilana é a principal composição da hemicelulose na palha ou grama que se dissolvem a partir do pH 10 enquanto em árvores de coníferos e em árvores de avenca é composta principalmente por glucomanano que se dissolvem pH alcalinos (Kucharska *et al*, 2018).

Sua hidrólise química é mais fácil do que a da celulose por ser a fração mais susceptível da lignocelulose e conseqüentemente mais sensível a processos químicos e térmicos. É estimado que se eliminar 50% da hemicelulose da biomassa aumenta a degradação da celulose, porém aumenta a formação de compostos biotóxicos como furfural e seus derivados (Kucharska *et al*, 2018).

A despolimerização da hemicelulose por processos químicos rende xilose com a maior fração e arabinose, manose, galactose e glicose como frações menores contando com os potenciais inibidores microbianos.

Os inibidores microbianos são divididos em três grupos: ácidos orgânicos (acético, fórmico e levulínico); derivados de furano (furfural e 5-hidroximetilfurfural ou 5-HMF); compostos fenólicos.

Tais inibidores afetam a fisiologia celular diminuindo a viabilidade, o rendimento e produtividade de bioetanol. Os micro-organismos etanologênicos tem a habilidade de degradar alguns desses inibidores porém a toxicidade do hidrolisado é definida pela junção de efeitos de compostos (Chandel *et al.*, 2011).

2.2.3.3 Lignina

Lignina é um heteropolímero insolúvel em água e sem forma. É composto por álcoois fenólicos: trans-p-cumarílico; trans-p-coniferílico; trans-p-sinafílico.

Também é um componente da parede celular e sua função biológica principal é formar uma estrutura impermeável que protege a planta do ataque de micróbios.

Normalmente a fermentação e hidrólise da celulose, lignina e ligação celulose-lignina são mais difíceis de ocorrer por serem insolúveis em água. A eliminação da lignina do meio favorece a digestão da biomassa. Já a presença da lignina inibe a hidrólise da biomassa devido a toxicidade dos derivados da lignina e adsorção não específica das enzimas hidrolíticas dentro da estrutura da lignocelulose. A deslignificação da biomassa quimicamente gera um aumento da área da fibra de lignocelulose e esse inchaço deixa as fibras expostas as enzimas celulolíticas (Kucharska *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019; Chandel *et al.*, 2011).

2.2.3.4 Pré-tratamento da lignocelulose

A lignina e a cristalinidade da celulose são consideradas a maior razão da recalcitrância nas rotas de conversão bioquímicas necessárias para a conversão da biomassa em biocombustíveis e bioprodutos. Logo, pré-tratamentos físicos, químicos e biológicos têm sido utilizados para aumentar o rendimento da atividade enzimática para fermentar os açúcares liberados da biomassa (Kucharska *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2019; Chandel *et al.*, 2011). Dependendo do tamanho e forma física da estrutura da biomassa lignocelulósica será necessário passar por pré-tratamentos mecânicos (Kucharska *et al.*, 2018).

Alguns desses pré-tratamentos são: uso de ácidos diluídos; expansão de vapor em água; expansão de fibra com amônia (AFEX), que possibilita quase completa conversão enzimática da celulose em glicose; enzimas lignolíticas; hidróxido de sódio ou ureia ou ácido fosfórico (85%), que solubiliza a celulose e melhora o rendimento da sacarificação; líquidos iônicos como cloreto de 1-butil-3-metillimidazólio ou solventes de celulose, como n-óxido de n-metilmorfolina, solubilizam a celulose a temperaturas relativamente baixas sem induzir uma ampla modificação dissolvendo a lignina e reduzindo a cristalinidade da celulose (Yang *et al.*, 2019).

2.2.4 Atividades metabólicas na Digestão Anaeróbia

2.2.4.1 Hidrólise

A hidrólise é a primeira etapa da digestão onde a ação conjunta de bactérias e arqueias degradam proteínas, carboidratos, lipídios e matérias recalcitrantes como alcanos, convertendo-os em aminoácidos, oligossacarídeos e ácidos graxos de cadeia longa (Suzuki *et al.*, 2015; Embree *et al.*, 2015).

A hidrólise é considerada um passo limitante durante a digestão anaeróbica devido ao alto conteúdo de materiais lignocelulósicos. Por isso muitos estudos tem focado no desenvolvimento de métodos de pré-tratamentos e estratégias de inoculação para melhorar a eficiência da hidrólise e consequentemente das etapas subseqüentes: acidogênese, acetogênese e metanogênese (Ozbyram *et al.*, 2018).

A bactéria utilizada atualmente no processo de hidrólise para degradar celulose e hemicelulose nas indústrias de produção de etanol é a *Zymomonas mobilis* (Abo *et al.*, 2019).

É comum o filo *Firmicutes* ser o mais dominante em um reator anaeróbico no estágio de hidrólise. Eles podem produzir várias enzimas hidrolíticas extracelulares como celulase e proteases que degradam a matéria orgânica. Protease (Qian *et al.*, 2019).

Téllez e Salles (2018) observaram que o consórcio contendo *Stenotrophomonas maltophilia*, *Paenibacillus sp.*, *Microbacterium sp.*, *Chryseobacterium taiwanense* e *Brevundimonas sp.* tiveram uma hidrólise mais efetiva como comunidade. Além disso relataram que *Paracoccus sp.* tem atividade na despolimerização e modificação da lignina; *Burkholderia sp.* secreta enzimas específicas para degradar celulose, hemicelulose, lignina e xilose da parede celular de plantas; e que *Burkholderia sp.* possui genes codificadores de para catalases e peroxidases que integram o complexo enzimático capaz de degradar lignina.

Um exemplo de reação de hidrólise da celulose é apresentado na figura 2.nApós a fase da hidrólise na digestão anaeróbica, inicia-se a etapa acidogênica.

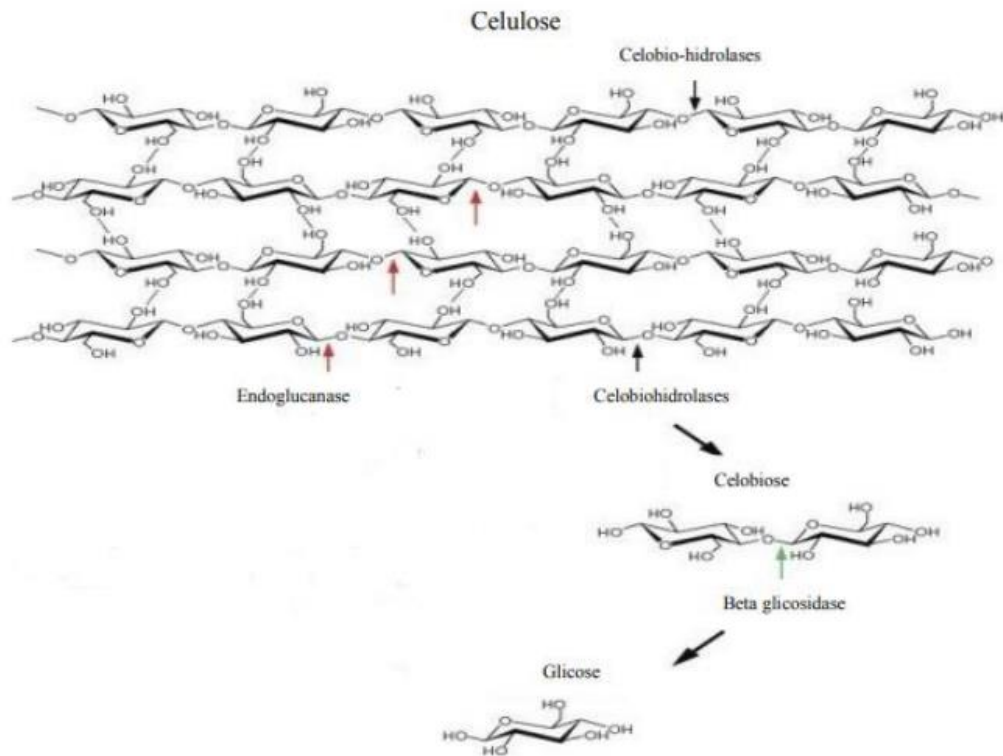


Figura 3: Hidrólise da celulose por ação sinérgica de enzimas (adaptado de Vilela (2013) por Menegatto, 2019).

2.2.4.2 Acidogênese

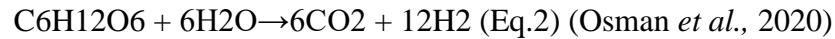
A acidogênese é o processo de conversão dos compostos gerados na hidrólise em ácidos voláteis orgânicos (Eq.1,2,3,4 e 5) (Suzuki *et al.*, 2015; Wainaina *et al.*, 2020). Nessa etapa também ocorre a formação de gases hidrogênio e carbônico (Eq.1) (Monlau *et al.*, 2013; Lima, 2018).

Alguns exemplos citados por Wainaina *et al.* (2020) são: os gêneros *Thermoanaerobacter*, *Acetomicrobium*, *Clostridium* que podem produzir ácido acético; os gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Sarcina* podem produzir ácido butírico ; outras espécies produtoras de ácido butírico são *Clostridium barkeri*, *C. thermobutyricum*, *Butyribacterium sp*, *Fusobacterium nucleatum*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, e *Eubacterium limosum*, *Clostridium tyrobutyricum*; ácido propiônico pelos gêneros *Propionibacterium*, incluindo as espécies *P. freudenreichii*, *P. acidipropionici*, *P. thoenii*, *P. shermanii* e *P. jensenii*; produção de ácido láctico pelos gêneros *Clostridium*, *Dysgonomonas*, e *Streptococcus*.

Formação de gás hidrogênio e carbônico:



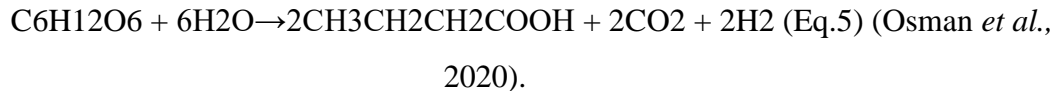
Formação de ácido acético:



Formação de ácido propiônico:



Formação de ácido butírico:



Em sequência, os subprodutos da acidogênese são levados para a fase da acetogênese.

2.2.4.3 Acetogênese

Na acetogênese as bactérias convertem os ácidos gerados durante acidogênese são convertidos a acetato, gás carbônico e hidrogênio (Eq.2,3 e 6) (Suzuki *et al.*, 2015; Wainaina *et al.*, 2020).

No estudo feito por Suzuki *et al.* (2015), observou-se que a maior classe de *Firmicutes* foi *Clostridia* (*Ruminococcaceae* e *Veillonellaceae*) que utilizaram mono e dissacarídeos para produzir acetato, etanol, hidrogênio e dióxido de carbono. Zhu *et al.* (2018) também foi observado o gênero *Clostridium* utilizando glicose para produzir acetona e butanol detalhando as espécies *Clostridium acetobutylicum*, *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium bovisfaecis sp.* Elizondo *et al.* (2018) observou que a espécie *Pleomorphomonas carboxyditropha* produz hidrogênio e gás carbônico a partir de monóxido de carbono. Wainaina *et al.* (2020) relatou algumas bactérias produtoras de hidrogênio como *Bacillus coagulans*, *Clostridium pasteurianum*, *Clostridium amygdalinum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium saccharobutylicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* e *Caldanaerobacter subterraneus*.



Após a produção de hidrogênio, acetato e gás carbônico, ocorre a metanogênese.

2.2.4.4 Metanogênese

A metanogênese ou como o próprio nome diz, é a formação de biogás metano. É a etapa final da digestão anaeróbica onde a formação de metano é feita a partir do acetato, gás

carbônico, hidrogênio por arqueias (Ziganshin *et al.*, 2016; Suzuki *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2014).

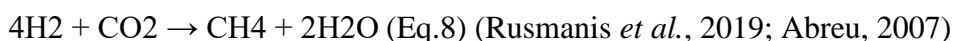
A fermentação de metano é feita por comunidades complexas e filogeneticamente diversas de micro-organismos (Arqueia e Bacteria) com funções metabólicas diferentes (Suzuki *et al.*, 2015). Além disso, metanogênicos do filo *Euryarchaeota* dentro do domínio da *Archaea* são importantes no ciclo de carbono global pois mineralizam resíduos de plantações e a matéria orgânica do solo sob condições anaeróbicas. São liberadas grandes quantidades de metano na atmosfera como produto final do metabolismo das arqueias (Kim *et al.*, 2014).

Existem dois subgrupos de arqueias dentro dessa fase: as arqueias acetoclásticas e as arqueias hidrogenotróficas.

-Arqueias acetoclásticas: produzem biogás metano a partir do acetato pela quebra e conversão do grupo metil a metano e do grupo carbonil em gás carbônico (Eq.7);



-Arqueias hidrogenotróficas: produzem biogás metano pela redução do gás carbônico com elétrons derivados do hidrogênio a partir de hidrogênio ou formato (Eq.8) (Bräsen *et al.*, 2014; Krzmarzick *et al.*, 2018). *Methanomassiliicoccales* é uma ordem de metanogênica hidrogenotrófica que produz biogás a partir da redução de metanol com hidrogênio como doador de elétrons e já foi encontrada em diversos ambientes anaeróbicos (Ziganshin *et al.*, 2016). Nesse grupo também incluem *Methanobrevibacter* e *Methanosphaera* (Baba *et al.*, 2019).



Diferentes metanogênicas hidrogenotróficas pode formar associações próximas com bactérias sintróficas acetato-oxidantes como *Clostridium ultunense*, *Syntrophaceticus schinkii*, e *Tepidanaerobacter acetatoxydans* em temperaturas elevadas ou com altas concentrações de amônia (Ziganshin *et al.*, 2016).

Em um estudo feito por Kim *et al.* (2014), foram encontradas em esterco bovino as famílias produtoras de metano *Methanobacteriaceae*, *Methanomicrobiaceae*, *Methanocellaceae* e *Methanosarcinaceae* enquanto que no suíno foram encontradas as famílias *Methanobacteriaceae* e *Methanosaetaceae*. Outros gêneros produtores de metano citados por Wainaina *et al.* (2020) são *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanosarcina*.

2.2.5 Inibidores da viabilidade microbiana

A toxicidade de um meio de cultivo depende dos tipos de inibidores e sua concentração, tipo de micro-organismo fermentativos, do modo de cultivo, das condições de cultivo como valores de pH e temperatura (Chandel *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2008).

O componente tóxico pode cessar o crescimento do micro-organismo afetando a taxa de captação de açúcar ao mesmo tempo que diminui a formação de produto. Esses inibidores afetam a fisiologia celular atrapalhando a função das membranas, fazendo com que o crescimento microbiano seja prolongado se estendendo o tempo de incubação com baixa produção de metabólitos (Chandel *et al.*, 2011).

Algumas das principais variáveis e inibidores que influenciam na da atividade microbiana num processo de fermentação são amônia, temperatura, pH e alguns substratos, que no caso deste trabalho os hidrolisados lignocelulósicos são o foco (Chen *et al.*, 2008).

2.2.5.1 Amônia

A formação de metano é desestabilizada por altas concentrações de amônia acumulada durante o processo de digestão anaeróbica. Essa inibição causa uma mudança na população microbiana cessando o crescimento bacteriano indicado pela redução da taxa de produção de biogás metano e acúmulo de ácidos orgânicos (Chen *et al.*, 2008; Suzuki *et al.*, 2015).

O íon amônio (NH_4^+) e amônia livre (NH_3) são as duas formas principais de nitrogênio de amônia inorgânica em solução aquosa. Por ser permeável a membrana a amônia livre é a principal causa da inibição. A molécula hidrofóbica da amônia se difunde passivamente dentro da célula causando um desequilíbrio de prótons e/ou deficiência de potássio (Chen *et al.*, 2008).

Os micro-organismos metanogênicos são os que mais sofrem com esse tipo de inibição sendo menos tolerantes e mais prováveis de cessar seu crescimento na presença de altas concentrações de amônia (Chen *et al.*, 2008).

2.2.5.2 Temperatura

É de fundamental importância manter a temperatura propícia para os micro-organismos produtores de hidrogênio e biogás metano, pois ela afeta o seu crescimento, as atividades das enzimas e conseqüentemente a hidrólise dos substratos disponíveis no meio. A condição mesofílica de 35°C é considerada a mais eficiente e favorável economicamente do que altas temperaturas e mais favorável para a produção de ácidos graxos voláteis alcançando maiores rendimentos (Chen *et al.*, 2008). Porém quando se leva em conta a composição dos ácidos produzidos a temperatura ótima é diferente. Por exemplo, em um estudo feito por Zhou *et al.*

(2018) durante a fermentação de efluente de alimentos, acetato e propionato são mais presentes gerados a 35°C e 45°C enquanto que quando se elevava a temperatura para 55°C butirato dominava 81% do meio de cultura.

2.2.5.3 pH

É importante manter o pH propício para os micro-organismos produtores de hidrogênio e biogás metano. De acordo com Si *et al.* (2019), o pH ótimo para maioria das bactérias hidrogenotróficas está na faixa de 4 a 6 enquanto que o pH neutro ou igual a 7 seria o ideal para a produção de biogás metano. Isso pode ser fortalecido pelo estudo feito por Schumacher *et al.* (2019) utilizando esterco bovino para a produção de biogás metano. Nesse estudo as maiores produções de biogás metano foram alcançadas com o pH próximo de 7.

O pH é um fator crítico que também controla a produção de ácidos graxos voláteis durante a acidogênese. O pH do sistema afeta na atividade dos micro-organismos porque a maioria das enzimas não podem tolerar ambientes ácidos (pH menor que 3) ou alcalinos (pH maior que 12). Logo o pH ideal deve favorecer ambas as etapas da hidrólise e acidogênese (Zhou *et al.*, 2018).

2.2.5.4 Hidrolisados lignocelulósicos

Importante enriquecer o meio de forma a estimular o crescimento dos micro-organismos produtores de hidrogênio e biogás metano. Entretanto a presença de alguns subprodutos gerados em “altas concentrações” durante o processo de fermentação inibem esse crescimento microbiano. Conseqüentemente ocorre a redução e/ou até mesmo interrupção da produção de biogases (Kucharska *et al.*, 2018; Monlau *et al.*, 2013 e Chandel *et al.*, 2011).

Hidrolisados lignocelulósicos podem inibir o crescimento bacteriano desestabilizando a membrana das células e atrapalhando o mecanismo de transporte de entrada e saída de compostos da célula. A degradação termoquímica da hemicelulose por exemplo, libera em sua maior parte monômeros de açúcar como xilose, manose, ácido acético galactose e glicose juntamente com um número de tóxicos inibidores para o micro-organismo fermentador. Alguns hidrolisados inibidores incluem furanos (furfural e 5-hidroximetil-furfural); fenólicos; ácidos fracos (ácido acético, levulínico, fórmico, etc.); extratos da matéria prima (resinas ácidas, ácidos tânico e terpeno); íons de metais pesados (ferro, cromo, níquel e cobre) (Kucharska *et al.*, 2018; Monlau *et al.*, 2013; Chandel *et al.*, 2011).

Segundo Chandel *et al.* (2011), a adaptação dos micro-organismos aos hidrolisados da lignocelulose que deve ser aprimorado. Para isso o pré-tratamento biológico dos materiais lignocelulósicos antes de fazer a hidrólise serviria como detoxificação dos inibidores gerados por hidrolisados de lignina. Tal pré-tratamento tornaria os micro-organismos resistentes aos inibidores. Ainda está pra ser determinado ou apresentado uma cepa bacteriana em que possa fazer a desintoxicação dos hidrolisados lignocelulósicos sem afetar os açúcares e outros nutrientes para o crescimento microbiano e conseqüentemente a geração do produto biotecnológico almejado, como etanol e biogases.

A adaptação de micro-organismos como as leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tanophillus* tem sido estudada para superar essa inibição e melhorar a fermentação e xilose na presença de hidrolisados lignocelulósicos (Chandel *et al.*, 2011).

Outras formas estudadas de detoxificação são as resinas de troca iônica, carvão ativado, detoxificação enzimática utilizando lacase, tratamento alcalino e adubagem com hidróxido de cálcio estão entre as estratégias de detoxificação nas quais tem sido apresentadas para superar os inibidores degradadores de parede celular dos micro-organismos (Chandel *et al.*, 2011).

Inibidores derivados da lignina incluem aldeídos, fenólicos e poliaromáticos. Suas toxicidades são ditas proporcionais aos seus pesos moleculares. Quanto menor o peso molecular dos compostos como os fenólicos maior é a letalidade para os micro-organismos. Os fenólicos são tóxicos mais ainda do que os furanos e ácidos fracos na inibição do crescimento microbiano. Eles causam uma partição e um distúrbio nas membranas afetando a habilidade delas de funcionarem como barreiras seletivas e matrizes de enzima atrapalhando o crescimento celular e a assimilação dos açúcares. Dentre os inibidores de ligninas estão vanilina, siringaldeído, ácido 4-hidroxibenzóico, catecol, acetosiringona e 1-hidroxibenzotriazol que causa uma partição e perda da integridade biológica das membranas nos micro-organismos diminuindo o crescimento celular e a assimilação de açúcar (Chandel *et al.*, 2011).

2.3 Metagenômica

O termo metagenômica foi usado primeiramente em uma microbiota de um solo e pela primeira vez reportada em 2008 em uma análise de uma planta alemã de biogás de grande escala tratando efluente de fazenda em uma digestão anaeróbica. A partir daí, muitos estudos examinaram a digestão anaeróbica sob a perspectiva taxonômica e funcional, permitindo assim a reconstrução de genomas e rotas metabólicas importantes para compreensão das interações

biológicas e otimização os bioprocessos. Diferentemente do primeiro relatório em 2008, que foi baseado em reatores de escala real, a maioria desses estudos tem sido feita em reatores de escala laboratorial (Christoff *et al.*, 2019).

Na digestão anaeróbica, a metagenômica explora e permite identificar quais bactérias e arqueias presentes no meio analisados são responsáveis pelas principais conversões em produtos biotecnológicos de interesse, como o biometano e biohidrogênio. Dessa forma ao identificar e quantificar as arqueias e bactérias de uma digestão anaeróbica facilitará a compreensão das funções de cada micro-organismo durante a produção de biogases e assim melhor estabelecer um bioprocessos mais seletivo, direcionado e com maior rendimento na produção de biogases (Christoff *et al.*, 2019; Delforno *et al.*, 2017; Delforno *et al.*, 2016).

A larga aplicação da digestão anaeróbica só é possível devido a ocorrência das interações complexas entre micro-organismos diversos pertencentes aos domínios *Bacteria* e *Archaea*. Entretanto a compreensão sobre os principais micro-organismos coadjuvantes nas condições anaeróbicas do lodo ainda é limitada. Isso leva ao uso da metagenômica como uma forma rica de explorar e conhecer tais micro-organismos e assim possibilitar aplicações biotecnológicas promissoras para a produção de biogases (Vendruscolo *et al.*, 2020; Christoff *et al.*, 2019; Delforno *et al.*, 2017; Delforno *et al.*, 2016).

Normalmente para desenvolver a metagenômica deve-se definir e coletar a amostra desejada; criar ou utilizar um kit de coleta da amostra já criado para esse tipo de amostra, de forma que possa ser coletado por exemplo com um *swab* e estoca-lo em um tubo com uma solução estabilizadora que conserve a amostra até uma data próxima a análise laboratorial. Um exemplo de kit de coleta é *Probiome* (Christoff *et al.*, 2019), utilizado para coletar amostras fecais com *swab* e que pode ser estocado a temperatura ambiente com solução estabilizante que pode ser entregue para análise em até 30 dias após a coleta. Após o laboratório recolher a amostras ocorre os seguintes passos: extração do DNA e sequenciamento do amplicon 16SrRNA para acessar a composição bacteriana da amostra por meio de bioinformática (Christoff *et al.*, 2019).

Algumas metodologias de sequenciamento fornecem resultados mais rápidos e de alta resolução revolucionando o ramo da microbiologia. Micro-organismos que ainda não podem ser cultivados até então podem agora ser profundamente caracterizados utilizando técnicas moleculares baseadas nas sequências de DNA. Muitas indústrias se beneficiam dessa

ferramenta precisa para caracterizar por exemplo micro-organismos patogênicos no ramo de alimentos, clínicas e farmacêuticas (Christoff *et al.*, 2019).

Alguns estudos como o realizado por Vendruscolo *et al.* (2020), a abordagem metagenômica foi utilizada para analisar a comunidade microbiana de dois biodigestores que diferem na capacidade de produção, arquitetura e alimentação. Nesse estudo foi feita a leitura de mais de um milhão de leituras da região V4 do gene 16rRNA , onde o filo principal identificado foi *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em ambos os digestores. Porém a maior biodiversidade e maior produção de metano foi encontrada no reator *UASB* alimentado com esterco bovino do que no segundo reator de tanque agitado contínuo (*CSTR*) alimentado com esterco de porco. Foi observado também nesse estudo que a estrutura da comunidade microbiana nos biodigestores mudam sazonalmente dependem do estágio de crescimento do animal.

De forma geral a metagenômica ocorre nos seguintes passos coleta e processamento de amostras; extração de DNA; sequenciamento e preparação da biblioteca de DNA; análise de bioinformática; comparação de dados e análise de diversidade (Arelli *et al.*, 2021; Christoff *et al.*, 2019; Vendruscolo *et al.*, 2020; Delforno *et al.*, 2017; Delforno *et al.*, 2016).

Atualmente o gene 16S rRNA é o marcador mais estudado e compreendido uma vez que tem boa resolução filogenética entre bactérias e uma das maiores bases de dados de sequência de DNA. Uma grande vantagem do sequenciamento do gene 16S rRNA é a possibilidade da leitura extensa bacteriana de amostras ambientais sem a necessidade do isolamento do micro-organismo. Esse gene contém nove regiões hipervariáveis (V1-V9) que podem ser utilizadas para estudos taxonômicos. A exatidão da identificação é diretamente dependente de diversos fatores em relação a preparação da biblioteca, do sequenciamento do DNA e da análise de dados (Arelli *et al.*, 2021; Christoff *et al.*, 2017; Delforno *et al.*,2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Comparar a composição e atividade metabólica dos micro-organismos identificados por metagenômica de amostras de ensaios metanogênicos realizados reatores UASB acrescido de diferentes inóculos e bagaço-de-cana de açúcar bruto, avaliando também a eliminação de arqueias na amostra com maior produção de metano após tratamento térmico.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Identificar, comparar e fazer análise funcional dos micro-organismos dos inóculos ou amostras retiradas inicialmente do ensaio de produção de metano, sendo essas inoc UASB, inóculo do lodo anaeróbio de reator UASB; inoc UASB+R, inóculo do lodo anaeróbio acrescido de rúmen bovino; e inoc UASB+FM inóculo do lodo anaeróbio acrescido de esterco bovino.

3.2.2 Identificar, comparar e fazer análise funcional das amostras retiradas no final dos ensaios metanogênicos de cada reator (quando a produção de metano cessou), sendo essas meth UASB, meth UASB+R e meth UASB+FM.

3.2.3 Identificar, comparar e fazer análise funcional da amostra com maior produção de metano tratada termicamente (inoc H₂ UASB+FM) com a não tratada termicamente (inoc UASB+FM), visando observar a eliminação das arqueias consumidoras de biogás hidrogênio.

4. METODOLOGIA

A metagenômica foi realizada com as amostras geradas durante o ensaio metanogênico realizado por Lima *et al.* (2020), cuja metodologia está descrita a seguir.

O bagaço de cana-de-açúcar foi coletado na empresa sucroalcooleira Bioenergética Aroeira®, localizada no Estado de Minas Gerais, em meados de 2014 (safra 2014/2015). O esgoto sanitário contido nos reatores UASB é instalado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento – CePTS – UFMG/COPASA, localizado na estação Arrudas, Belo Horizonte, MG. O rúmen e esterco bovino foram retirados de animais fistulados e fornecidos pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. O departamento forneceu também a autorização para trabalhar com tais micro-organismos (Número do comitê de ética: 42/2016) . Para avaliar a maximização de produção de biogás metano foram preparados e avaliados três inóculos anaeróbios de fontes diferentes:

- i) UASB: constituído por micro-organismos coletados de um reator anaeróbio (UASB) alimentado com esgoto sanitário;
- ii) UASB+R: constituído por 50% da mesma mistura contida no reator UASB e 50% do rúmen bovino.
- iii) UASB+FM: constituído de 50% do mesmo inóculo do reator UASB com a adição de 50% de estrume bovino fresco.

Os ensaios de produção de biogás metano foram realizados em frascos de vidro ($V_{\text{útil}} = 100 \text{ mL}$) vedados com tampa de borracha, utilizando apenas 60% do volume para a fase líquida (40 mL *head space*) e 5g de bagaço de cana-de açúcar bruto. Esses frascos foram incubados a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ e 150 rpm em *shaker* (Thoth®, modelo 6440) pelo tempo necessário ao encerramento da produção de biogás. A produção de biogás foi monitorada diariamente por meio da aferição da sua pressão e composição, registrando o volume acumulado de hidrogênio e/ou de metano. Para tal foi analisada a pressão dos frascos (Manometer®, modelo PM-9100HA) e quantificados as porcentagens de volume (% v/v) de metano presente no biogás por meio do cromatógrafo de fase gasosa (CG) (Shimadzu®, modelo 2014/TCD). A tabela 2 apresenta os valores da produção de biogás metano realizado por Lima *et al.* (2020).

Tabela 2: Produção acumulada de metano ($\text{NLCH}_4/\text{kg}_{\text{SV}}$) obtida na digestão anaeróbia do bagaço bruto sem pré-tratamento, com os três inóculos UASB (só esgoto), UASB+R(esgoto e rúmen bovino) e UASB+FM(esgoto e esterco bovino) em ensaio realizado por Lima *et al* (2020)

Tipo de Inóculo	CH₄ (NL_{CH4}/kg_{sv})
UASB	85,6 (± 2,8)
UASB+R	100,0 (± 3,6)
UASB+FM	143,3 (± 4,9)

O tratamento térmico para eliminação de arqueias foi realizado no inóculo que produziu mais metano. Para isso tal inóculo foi previamente aquecido em autoclave (100 °C por 2 h) mantendo o pH do meio levemente ácido (pH ~ 5,5 ± 0,2).

4.1 Metagenômica

Foram recolhidas 1 mL de cada amostras retiradas para metagenômicas foram:

- i) Do início do ensaio, ou seja, dos inóculos de cada reator sendo essas nomeadas: inoc UASB, inoc UASB+R e inoc UASB+FM de cada inóculo,
- ii) No final do ensaio, quando cessou a produção de metano em cada reator, sendo essas nomeadas: meth UASB, meth UASB+R e meth UASB+FM.

Cada uma dessas amostras foram centrifugadas, removeu-se o sobrenadante e seus *pellet* congelados e enviados para o laboratório Neopropecta Microbiome Technologies que realizou os procedimentos de extração, quantificação e sequenciamento com a metodologia descrita seguir.

4.1.1 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando-se a técnica de *beads* magnéticas, com um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil).

O DNA foi quantificado utilizando-se o fluorímetro Qubit, com o kit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, EUA). Após quantificação o DNA foi diluído a 0,5ng/μl.

4.1.2 Sequenciamento de alto desempenho da região V3/V4 do gene 16S rRNA (bactérias):

A identificação de bactérias foi realizada utilizando-se o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA. O preparo das bibliotecas seguiu um protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Foi realizada a amplificação com primers para região V3-V4 do gene rRNA 16S, 341F

(CCTACGGGRSGCAGCAG, doi: 10.1371/journal.pone.0007401) e 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT, doi: 10.1038/ismej.2012.8). As bibliotecas foram sequenciadas utilizando-se o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA) e o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento *single-end*. As sequências foram analisadas por meio de um *pipeline* proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). Resumidamente, todas as sequências de DNA resultantes do sequenciamento passaram, individualmente, por um filtro de qualidade, utilizando como base o somatório das probabilidades de erro de suas bases, permitindo no máximo 1% de erro acumulado. Posteriormente, foram removidas as sequências de DNA correspondentes aos adaptadores da tecnologia Illumina. As sequências que passaram pelos procedimentos iniciais e que tiveram 100% de identidade foram agrupadas em filotipos/*clusters* e foram utilizadas para identificação taxonômica, por comparação com banco de dados de sequências acuradas de 16S rRNA (NeoRef, Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil).

4.2 Análise e comparação de dados

Os grupos taxonômicos foram agrupados, ordenados alfabeticamente e classificados de acordo com sua abundância percentual utilizando a ferramenta Excel. Os micro-organismos com abundância menor que 1% foram agrupados no grupo “Outros”.

Em seguida fez-se a pesquisa, estudo e análise das funções metabólicas dos grupos taxonômicos, focando-se nos gêneros e posteriormente nas espécies encontradas nas amostras utilizando as ferramentas de vias metabólicas presentes no site *KEGG* (Kanehisa *et al.*, 2021) e por meio de leitura de artigos disponíveis no site *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*).

Comparou-se a abundância dos grupos comuns entre as amostras e os exclusivos de cada amostra de forma a identificar os micro-organismos mais importantes na maior produção de metano. Foi realizado o mesmo passo para a amostra tratada termicamente acrescentado a observação da eliminação das arqueias.

O grupo “Outros” foi posteriormente apresentado e suas presenças e abundâncias relativas comparadas e discutidas se foram relevantes na maior produção de metano.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Comparação da comunidade microbiana dos inóculos e o efeito da sua composição na produção de metano

De acordo com Lima *et al* (2020), entre os três inóculos estudados no presente trabalho, a fortificação do inóculo anaeróbico com estrume fresco bovino (inoc UASB+FM) acarretou em maior produção de metano (143,3 NL_{CH4}/kg_{SV}), como pode ser observado na tabela 2. Esse enriquecimento proporcionou um aumento de 67% na produção de metano quando comparada com a produção em que apenas o inóculo anaeróbico de reator UASB foi adicionado (85,6 NL_{CH4}/kg_{SV}). Já o inóculo anaeróbico fortificado com micro-organismos do rúmen bovino (inoc UASB +BR) proporcionou um aumento de 17 % na biometanização do bagaço de cana bruto, produzindo 100,0 NL_{CH4}/kg_{SV}.

A fim de comparar a diversidade microbiana dos três inóculos estudados, foi utilizada a técnica de NGS (*new-generation sequencing*) para identificação taxonômica das bactérias e arqueias. O total de sequências encontradas em todos os reatores dos ensaios foram 31028. Dos três inóculos utilizados, o inóculo anaeróbico UASB, sem fortificação com rúmen ou esterco bovino (inoc UASB), apresentou maior quantidade de sequências detectadas, totalizando 8619 sequências ou 27,78% do total da taxonomia encontrada. O inóculo anaeróbico fortificado com esterco bovino (inoc UASB+FM) contou com 4027 sequências ou 12,98% do total da taxonomia encontrada. A menor percentagem relativa de gêneros encontrados dentre todas as amostras corresponde ao inóculo anaeróbico fortificado com rúmen bovino (inoc UASB+R) com 12,66% do total da taxonomia encontrada ou 3928 sequências detectadas.

Logo pode se observar que a maximização da produção de metano não está atrelada a maior quantidade de sequências encontradas no reator, mas provavelmente pelas atividades metabólicas dos micro-organismos presentes no inóculo enriquecido com estrume bovino que não estavam presentes nos outros inóculos.

Observando o *heatmap* na figura 15 (no apêndice) e a figura 4 que comparam a abundância de gêneros identificados nos três tipos de inóculos, nota-se que os gêneros *Clostridium* e *Methanobacterium* foram os mais abundantes dos domínios Bacteria e Archaea, respectivamente, em todos os inóculos,

A maior porcentagem de abundância do gênero *Clostridium* foi identificada no inóculo anaeróbio sem enriquecimento (inoc UASB) totalizando 87% da comunidade microbiana no reator, enquanto no inóculo anaeróbio enriquecido com esterco bovino (inoc UASB+ FM) essa porcentagem foi de 22%. A menor proporção detectada de *Clostridium* foi no inóculo anaeróbio fortificado com rúmen, um total de 19,06% (inoc UASB+R). Já o inóculo com maior abundância do gênero metanogênico *Methanobacterium* foi também o inóculo anaeróbio sem fortificação (inoc UASB), com 25,98% da comunidade microbiana, seguido pelo inóculo enriquecido com esterco bovino (inoc UASB+ FM), 18,02% e por fim o inóculo anaeróbio com adição de rúmen, com 16,77% (inoc UASB+R). Outros gêneros que estavam abundantes nos três inóculos porém em porcentagem menor que 5,5% foram: *Bosea*, *Paracoccus*, *Pleomorphomonas*, *Sarcina* e *Shinella*. Desta forma, a presença destes gêneros em todos os inóculos sugere que os mesmos sejam oriundos do inóculo anaeróbio proveniente de reator UASB.

Os gêneros com abundância maior que 5% identificados somente no inóculo anaeróbio enriquecido com esterco (inoc UASB+FM) foram *Anaerobaculum* (13,98%), *Peptoclostridium* (7,90%) e *Pseudomonas* (5,26%). Assim, considerando que este inóculo promoveu uma maior produção de metano, é possível que a atividade desses gêneros no acesso aos açúcares lignocelulósicos e na geração dos substratos para a metanogênese seja a razão pelo melhor desempenho. Já o gênero *Methanoculleus* foi o único gênero encontrado somente no inóculo enriquecido com rúmen bovino (inoc UASB+R), abrangendo 11,10% da comunidade microbiana identificada. Neste caso trata-se de um gênero metanogênico cujo papel no consórcio foi contribuir para a produção de metano.

Levando em consideração os gêneros (figura 4) e espécies (figura 16 no apêndice) encontradas nos inóculos, pôde-se fazer um levantamento das atividades metabólicas relativas presentes em cada inóculo e provavelmente ocorrentes nas primeiras semanas do ensaio de produção de metano. As características metabólicas das bactérias e arqueias identificadas foi investigada, de acordo com banco de dados de sequências acuradas de 16S, e foram agrupadas considerando as etapas metabólicas da digestão anaeróbia, a saber metabolismo hidrolítico, acidogênico, acetogênico e metanogênico. Estes resultados estão apresentados na Figura 5.

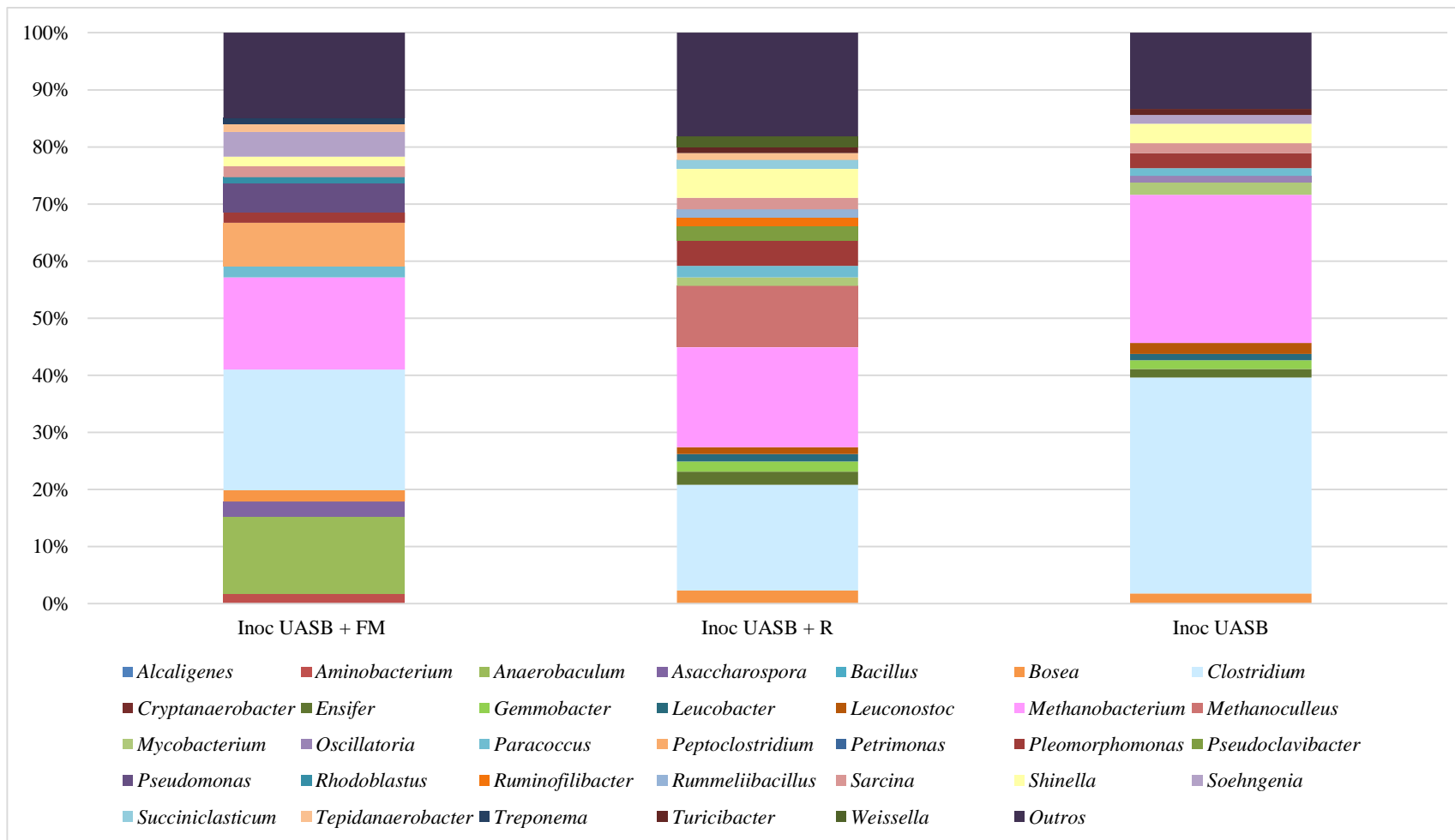


Figura 4: Gráfico comparativo da abundância percentual (maior que 1%) dos gêneros presentes nas amostras dos inóculos dos ensaios metanogênicos. *Outros: abundância menor que 1%.

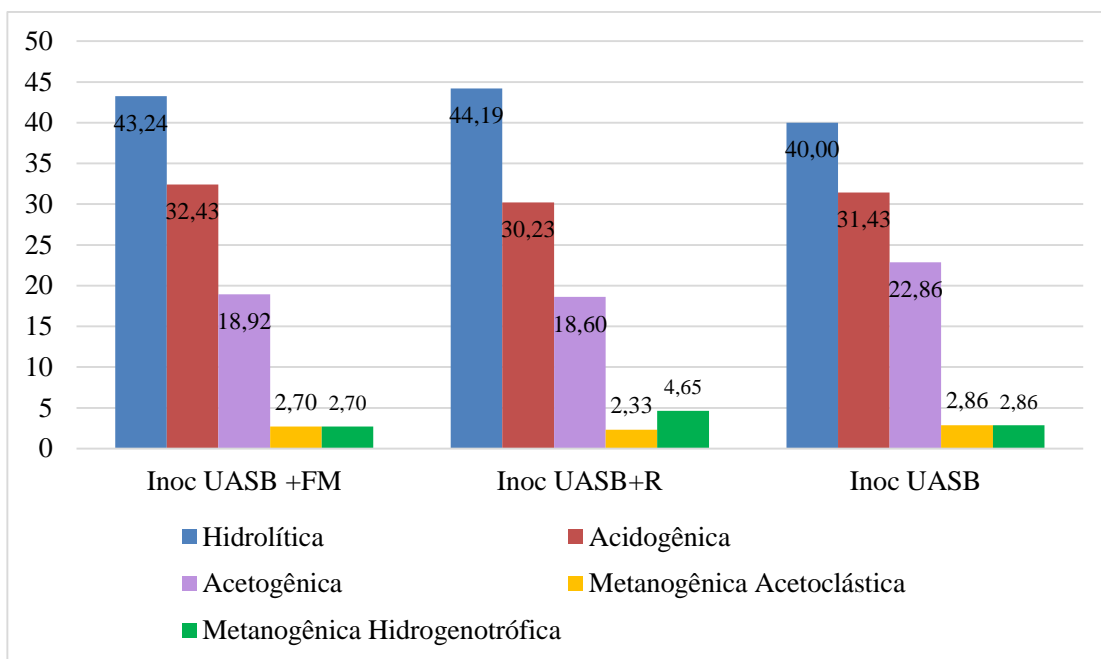


Figura 5: Gráfico comparativo das atividades metabólicas dos gêneros contidos inóculos dos ensaios metanogênicos.

De uma forma geral observa-se que a fortificação do inóculo anaeróbico UASB com micro-organismos ruminais e com micro-organismos do esterco promoveu um ligeiro aumento (em torno de 10%) de micro-organismos com atividade hidrolítica. Considerando que a liberação de açúcares fermentescíveis da palha de cana de açúcar depende desta atividade, o aumento observado pode ter contribuído para a produção dos substratos metanogênicos, consequentemente, aumentando a produção de metano.

O gênero *Clostridium* que apresentou maior abundância em todos os inóculos, possui atividades hidrolítica, acidogênica, acetogênica (tabela 3, apêndice); capacidade de produzir esporos, podendo sobreviver assim a tratamentos térmicos (Dürre, 2014 e Shen *et al.*, 2019); capacidade de produzir hidrogênio (Bao *et al.*, 2012; Dürre, 2014 ;Yang *et al.*, 2019). A espécie *Clostridium disporicum* encontrada nos inóculos (figura 16 no apêndice) sem enriquecimento (inoc UASB) e enriquecido com estrume bovino (inoc UASB + FM), além de ter atividade sacarolítica, também degrada glicoproteínas grandes como a mucina, encontrada no intestino humano (Raimondi *et al.*, 2021). Já a espécie *Clostridium perfringens* encontrada somente no inóculo enriquecido com rúmen (inoc UASB + BR) é conhecida por produzir enterotoxinas (Dürre, 2014). Enquanto a espécie *Clostridium ruminantium* foi encontrada nos três inóculos. Arelli *et al.* (2021) cita que com a adição da bactérias *Clostridium thermocellum* na biomassa

lignocelulósica aumentou o rendimento de biogás metano em 39% e em estudo feito com palha de trigo, a bioaugmentação com a bactéria *Clostridium cellulolyticum* produção de biogás aumentou em 13%. A partir disso, pode-se dizer que o gênero *Clostridium* é importante no processo de digestão anaeróbia para produção de biogás.

Methanobacterium, o segundo gênero mais abundante nos três inóculos após o *Clostridium* teve *Methanobacterium kanagiense* como única espécie identificada (Figura 16 no apêndice). *Methanobacterium kanagiense* só utiliza hidrogênio e gás carbônico (Kitamura *et al.*, 2011) para produção de biogás metano.

Observando-se as atividades metabólicas relativas de cada inóculo apresentadas na figura 5, o inóculo alimentado com rúmen bovino (inoc UASB+R) possui ligeiramente uma maior atividade metanogênica hidrogenotrófica dentre os outros dois inóculos. Isso se deve ao fato desse inóculo possuir dois gêneros que necessitam de hidrogênio e dióxido de carbono para produção de metano: os gêneros *Methanobacterium* e *Methanoculleus*. A espécie encontrada de *Methanoculleus* foi *Methanoculleus bourgensis* (figura 16 no apêndice) que produz metano a partir 1-2 propanol, de hidrogênio e gás carbônico, porém não produz a partir de acetato (Manzoor *et al.*, 2016). Logo ambas espécies produtoras de metano encontradas no inóculo enriquecido com rúmen bovino (inoc UASB+R) não utilizam acetato para tal.

Em uma co-digestão feita por Leite *et al.* (2015) com filtro de torta e bagaço de cana-de-açúcar, revelou a presença dos gêneros metanogênicos *Methanosarcina* (acetoclástica e hidrogenotrófica); *Methanosaeta* (acetoclástica); *Methanoculleus*, *Methanoregula* e *Methanobacterium*. (hidrogenotróficos) .

Dentre os gêneros encontrados somente no inóculo que obteve maior produção de metano, inoc UASB +FM, observa-se que o gênero *Anaerobaculum* teve somente a espécie *Anaerobaculum mobile* identificada (figura 16 no apêndice). Essa espécie é capaz de fermentar glicose, glicerol e ácidos orgânicos (piruvato, tartarato, malato) a acetato, gás hidrogênio e gás carbônico (Mavromatis *et al.*, 2013). Lembrando que tais substratos são utilizados por *Methanobacterium kanagiense* para produção de biogás metano.

O gênero *Peptoclostridium* não teve espécie identificada. Um exemplo de espécie é a *Peptoclostridium acidaminophilum*, conhecida por fermentar aminoácidos transformando os em acetato e gás carbônico mas não possui a capacidade de degradar carboidratos (Mei *et al.*, 2020 e Kim *et al.*, 2020).

Observando-se na tabela 3, o gênero *Pseudomonas* possui somente atividades hidrolítica e acidogênica. A espécie encontrada no inóculo enriquecido com esterco bovino, *Pseudomonas stutzeri* (figura 16 no apêndice) metaboliza compostos aromáticos, proteínas, ácidos graxos, hidrocarbonetos alifáticos, tiosulfato e metais pesados (Lalucat *et al.*, 2006; Pathak *et al.*, 2021), faz a fixação de nitrogênio e desnitrificação (Vermeiren *et al.*, 1999; Lalucat *et al.*, 2006) e utilizar gás hidrogênio como doador de elétrons (Xiao *et al.*, 2016). Essa espécie então pode reduzir a quantidade de substratos inibidores do crescimento microbiano e estimular assim a atividade metanogênica da bactéria *Methanobacterium bourgensis*. Como os outros inóculos não continham essa espécie, pode-se dizer que *Pseudomonas stutzeri* é o grande diferencial do inóculo enriquecido com estrume, dando o suporte para a remoção de compostos inibidores das atividades metabólicas microbianas necessárias a produção de metano.

De forma geral, observando-se a figura 5, nota-se que a hidrólise e a produção de ácidos foram as atividades mais predominantes nos inóculos dos ensaios metanogênicos. A acetogênese fica em terceiro lugar dentre as atividades metabólicas apresentadas. As atividades metanogênicas ocupam a menor porcentagem, sendo as metanogênicas hidrogenotróficas um pouco maior que as acetoclásticas. Isso pode ser compreendido tendo em vista que a produção de metano é dependente dos produtos como o hidrogênio, dióxido de carbono e acetato, oriundos das atividades precedentes a fase metanogênica (hidrolítica, acidogênica e acetogênica).

5.2 Comparação da comunidade microbiana ao final dos ensaios de produção de metano com os diferentes inóculos.

Dentre as amostras dos ensaios metanogênicos coletadas ao final da produção de biogás, a do reator UASB fortificado com rúmen bovino (meth UASB + BR) continha a maior quantidade de sequências de gêneros identificados (3818 sequências ou 17,04% do total da taxonomia detectada). Em seguida foi a amostra que foi enriquecida com estrume bovino fresco – meth UASB+FM - (2119 sequências ou 9,46% do total da taxonomia detectada) e por último a amostra final que não fortificação de inóculo – meth UASB (862 ou 3,85% do total da taxonomia encontrada).

Observando-se o *heatmap* na figura 17 e a abundância relativa apresentada graficamente na figura 6 pode-se tirar as seguintes conclusões descritas a seguir. O gênero *Alcaligenes* é o gênero em comum mais abundante em todos os inóculos, sendo que a amostra retirada do reator

cujo inóculo anaeróbio não foi fortificado (meth UASB) continha a maior abundância desse gênero com 45,59%, seguido por 31,85% em abundância da amostra enriquecida com rúmen bovino (meth UASB + BR) e por final a amostra enriquecida com esterco bovino (meth UASB + FM) com 28,13%.

Outro gênero em comum nas três amostras finais porém em abundância percentual menor que o *Alcaligenes*, foi o *Anaerobaculum*. Tal gênero tinha abundância de 16,62% no reator enriquecido com estrume bovino (meth UASB +FM), 3,13% na amostra final do reator sem enriquecimento (meth UASB) e apenas 1,47% para o enriquecido com rúmen bovino (meth UASB + BR).

Como mostrado no *heatmap* na figura 17 os gêneros abaixo do limite de detecção nas três amostras finais do ensaio metanogênico foram: *Aminobacterium*, *Asaccharospora*, *Bosea*, *Ensifer*, *Gemmobacter*, *Leucobacter*, *Leuconostoc*, *Methanoculleus*, *Mycobacterium*, *Oscillatoria*, *Paracoccus*, *Peptoclostridium*, *Pleomorphomonas*, *Pseudoclavibacter*, *Rhodoblastus*, *Rummeliibacillus*, *Sarcina*, *Shinella*, *Succiniclasticum*, *Treponema*, *Turicibacter* e *Weissela*.

Vale ressaltar que o gênero *Ruminofilibacter* foi encontrado em elevada abundância nos ensaios inoculados com lodo anaeróbio UASB (58,72%) e com lodo anaeróbio e rúmen (meth UASB+R, 29,35%) enquanto estava abaixo do limite de detecção na amostra que obteve maior produção de metano, cujo inóculo anaeróbio foi enriquecido com esterco bovino (meth UASB + FM).

O único gênero identificado somente na amostra final do reator enriquecido com rúmen bovino (meth UASB + R) foi *Cryptanaerobacter* com 1,02% em abundância. A amostra final do reator sem enriquecimento (inoc UASB) não continha nenhum gênero exclusivo.

Apesar da baixa abundância, o gênero produtor de metano *Methanobacterium* está presente na amostra final do reator que obteve maior produção de metano (UASB+FM), com apenas 1,08% e também com porcentagem maior, no reator sem enriquecimento com 3,13% (*heatmap* na figura 17). Logo a explicação da maior produção de biogás metano se encontrará na identificação dos gêneros que estiveram presentes unicamente no reator UASB+FM, que conjuntamente com gêneros em comum com outros reatores, proporcionaram a melhor simbiose para a produção do biogás metano.

Observando-se então o *heatmap* na figura 17, dentre as três amostras finais, os gêneros somente identificados na amostra final do reator enriquecido com esterco bovino (meth UASB+FM) foram: *Pseudomonas* (31,81%), *Bacillus* (8,82%), e *Soehngenia* (2,69%).

Comparando os *heatmaps* das figuras 15 e 17 (ambos no apêndice), dentre os três gêneros citados anteriormente, somente os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* foram bactérias exclusivas do biorreator UASB+FM (esterco bovino).

Também por meio da comparação desses *heatmaps*, observa-se o aumento da abundância do gênero *Pseudomonas* de 5,26% para 31,81%. Tendo em vista que as espécies do gênero *Pseudomonas* possuem capacidade detoxificante (Lalucat *et al.*, 2006; Pathak *et al.*, 2021; Areli *et al.*, 2021), pode-se dizer que sua exclusiva e maior abundância no final da digestão no biorreator UASB+FM bovino foi determinante na maior produção de metano.

Da mesma maneira que nos inóculos, observando-se a figura 6, a hidrólise e a produção de ácidos são mais predominantes nas amostras finais dando sequência a acetogênese. Por último as atividades metanogênicas hidrogenotróficas ainda permaneceram um pouco maior que as acetoclásticas indicando a dependência da produção de biogás metano das atividades anteriores

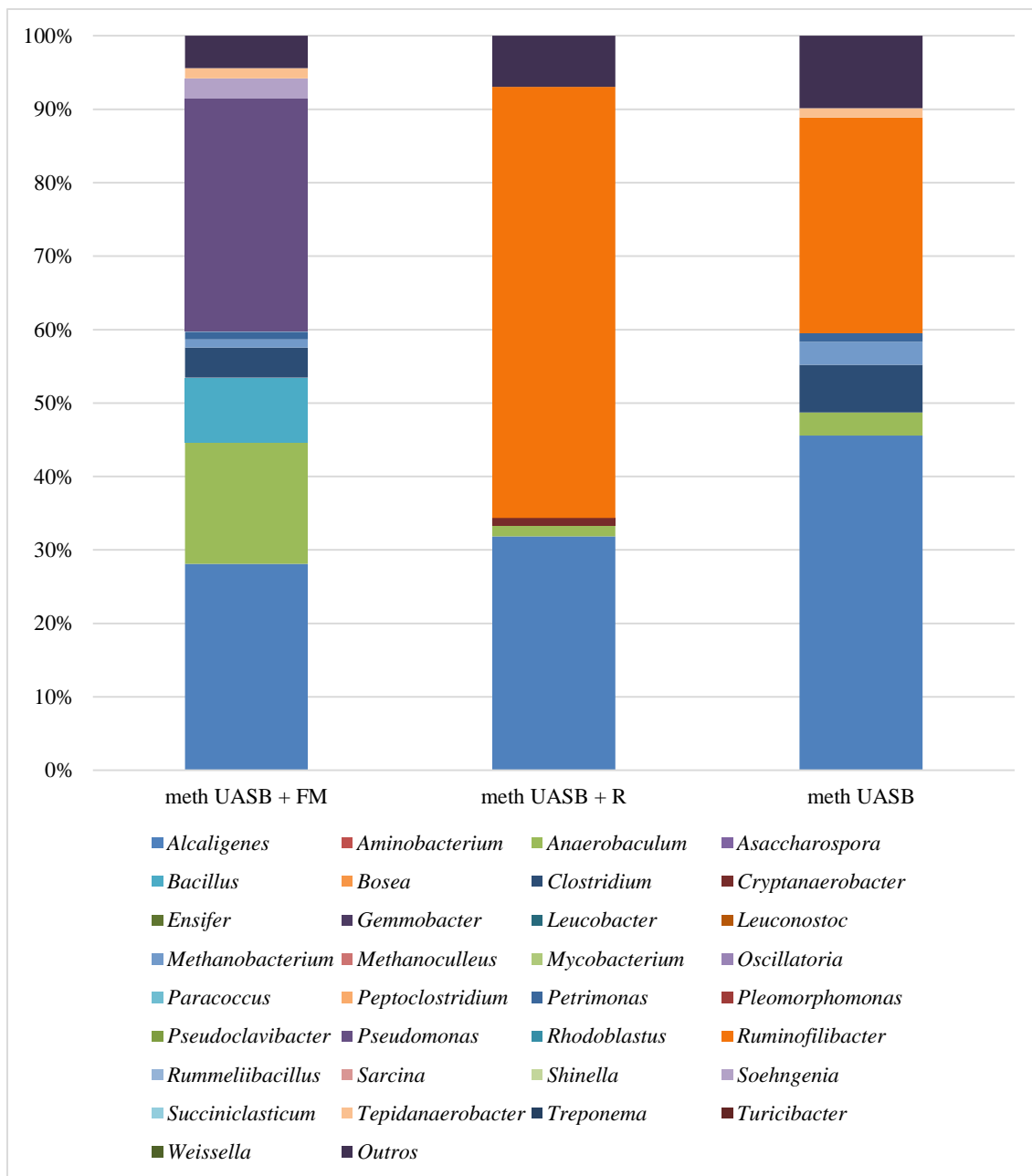


Figura 6: Gráfico comparativo da abundância percentual dos gêneros presentes nas amostras finais dos ensaios metanogênicos.

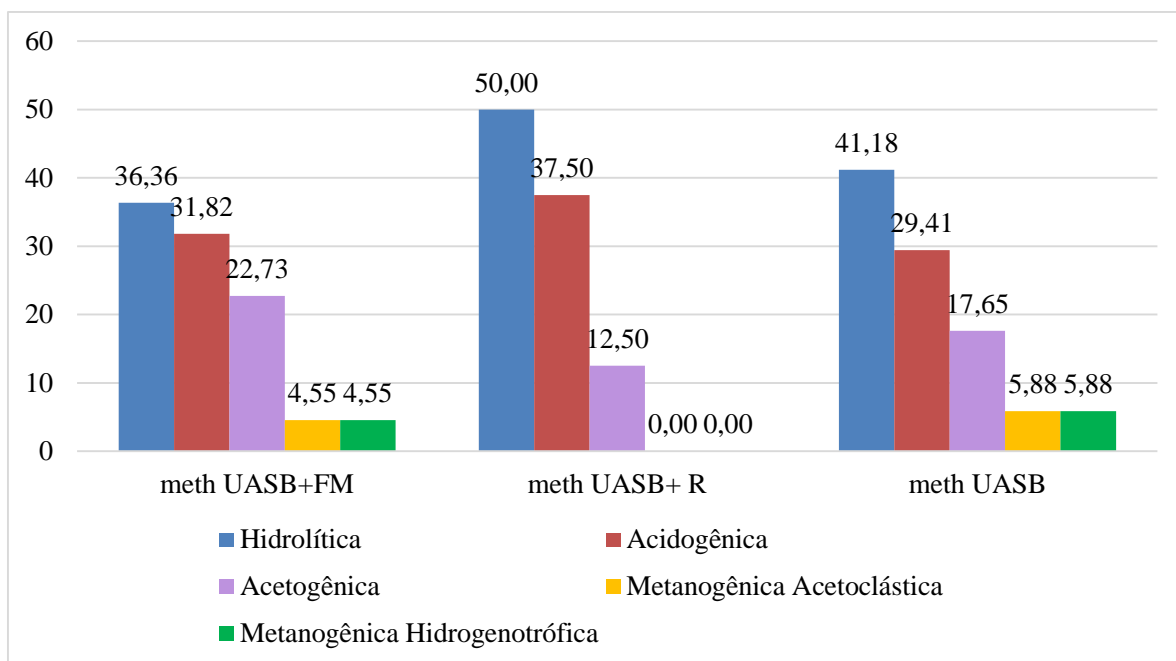


Figura 7: Gráfico comparativo das atividades metabólicas das amostras finais dos ensaios metanogênicos.

Todos os gêneros tiveram espécies identificadas com exceção dos gêneros *Peptoclostridium* e *Petrimonas*.

O gênero *Alcaligenes* possui funções hidrolítica, acidogênica e acetogênica (Kanehisa *et al.*, 2021). A espécie identificada nas três amostras finais do ensaio metanogênico foi *Alcaligenes faecalis* (figura 18 no apêndice), espécie conhecida por metabolizar metais pesados como arsênio, micropoluentes como o produto farmacêutico ibuprofeno, corantes como alaranjado de metila (Zarrin *et al.*, 2018) e até mesmo ocratoxina A produzida por fungos (Zhang *et al.*, 2017). Também possui ação nitrificante e faz a remoção de amônia por desnitrificação (Felestrino *et al.*, 2020; Kesik *et al.*, 2006; Nishio *et al.*, 1998).

Alguns estudos tem relatado que gênero *Alcaligenes* tem mostrado que a capacidade de auxiliar a remoção de biogás metano: na produção do bioplástico polihidroxialcanoato (PHA) utilizando preferencialmente biogás metano fonte de carbono e amônia como fonte de nitrogênio (Puyol *et al.*, 2017; Peña *et al.*, 2014); redução da emissão biogás metano em 35% em condições aeróbicas em um reator de batelada sequencial contendo resíduo sólido lixiviado municipal quando comparado a um anaeróbico sem sua presença (Nuansawan *et al.*, 2020); seu uso em uma fermentação anaeróbia de efluente municipal para aumentar a capacidade de

redução de biogás metano dentro de um consórcio microbiano de bactérias amônio e metano oxidantes (Pan *et al.*,2019).

Assim pode-se sugerir que pelo fato da capacidade de *Alcaligenes faecalis* remover biogás metano do meio, o reator que teve maior abundância dessa espécie provavelmente obterá menor quantidade desse biogás detectada. Isso pode ser comprovado ao observar a produção de metano e a abundâncias respectivas de cada um. Observando novamente a tabela 2, o reator UASB, que teve a menor produção de biogás metano (85,6 NL_{CH4}/kg_{SV}) foi o que continha a maior abundância dessa espécie (45,59%); o UASB+R que teve a segunda maior abundância (31,85%) produziu 100,0 NL_{CH4}/kg_{SV}; e o reator UASB +FM que teve a maior produção de metano (143,3 NL_{CH4}/kg_{SV}) foi o que tinha a menor abundância de *Alcaligenes faecalis* (28,13%).

Dentre as espécies do gênero *Anaerobaculum*, duas espécies foram identificadas ao final do ensaio metanogênico inoculado com lodo UASB+FM: *Anaerobaculum mobile* e *Anaerobaculum hydrogeniformans* (figura 18 no apêndice). A primeira, como descrito anteriormente, capaz de fermentar glicose, glicerol e ácidos orgânicos (piruvato, tartarato, malato) a acetato, gás hidrogênio e gás carbônico enquanto a segunda espécie presente nessa amostra, também forma acetato, gás hidrogênio e gás carbônico a partir de glicose (Mavromatis *et al.*, 2013).

Já o gênero *Pseudomonas* possui somente atividades hidrolítica e acidogênica (tabelas 4). *Pseudomonas stutzeri*, a espécie encontrada nos reatores, é capaz metabolizar compostos aromáticos, proteínas, ácidos graxos, hidrocarbonetos alifáticos, tiosulfato, metais pesados (Lalucat *et al.*, 2006; Pathak *et al.*, 2021), fazer a fixação de nitrogênio e desnitrificação (Vermeiren *et al.*, 1999; Lalucat *et al.*, 2006) e utilizar gás hidrogênio como doador de elétrons (Xiao *et al.*, 2016). Isso indica que essas atividades metabólicas feitas por *Pseudomonas* são importantes nas atividades metabólicas iniciais e finais deste reator resistindo as transformações bioquímicas deste reator. Na digestão anaeróbia contendo bagaço de cana-de açúcar, as espécies de *Pseudomonas* são micro-organismos que além de degradar a biomassa lignocelulósica solubilizar a celulose, são capazes de tolerar ambientes com toxinas, variações de pH e temperatura (Arelli *et al.*,2021).

Já o gênero *Ruminofilibacter* possui atividades hidrolíticas e acidogênicas tendo espécies com atividades celulolítica (Dong *et al.*, 2019) hemicelulolíticas (Wang *et al.*, 2020) e

xilanolíticas (Baba *et al.*, 2019). A espécie encontrada nas amostras finais foi *Ruminofilibacter xylanolyticum* (figura 18 no apêndice) cuja atividade principal é a degradação da xilana presente no bagaço de cana (Lin *et al.*, 2016; Baba *et al.*, 2019). Essas atividades contribuem para aumentar a produção de substratos gerados pela degradação do bagaço de cana e elevar a produção de metano por gêneros metanogênicos (Ince *et al.*, 2019) como *Methanobacterium*.

O gênero *Soehngenia* possui atividades hidrolítica, acidogênica e acetogênica (tabela 4). A espécie encontrada somente na amostra final do reator com lodo anaeróbio enriquecido com estrume bovino (UASB+FM) foi *Soehngenia saccharolytica* (figura 18 no apêndice) que utiliza como substratos glicose, frutose, sacarose, xilose, arabinose, manose, ribose, maltose, celobiose, galactose, lactose, celulose, xilana, malato, amido, cisteína, serina e caseína. Alguns produtos da sua fermentação são etanol, gás carbônico, acetato, propionato, butirato e valerato (Parshina *et al.*, 2003).

Apresentado na tabela 3, o gênero *Bacillus* possui as atividades hidrolítica, acidogênica e acetogênica. A espécie encontrada somente no reator UASB+FM foi *Bacillus acidicola* (figura 18 no apêndice) que é conhecido pela produção da enzima α -amilase (Mehta *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2013) e hidrolisar celulose (Yang *et al.*, 2019).

Observando e comparando os *heatmaps* presentes nas figuras 15 e 17, houve aumento dos gêneros detoxificantes no reator UASB+FM, que produziu mais metano: *Pseudomonas* (de 5,26% para 31,11%) e *Alcaligenes* (de 0% para 28,13%) tiveram aumento na sua abundância apesar do gênero detoxificantes *Clostridium* ter sofrido uma redução em sua abundância (de 22% para 4,10%).

Pode-se concluir que melhor desempenho do inóculo anaeróbio UASB acrescido de esterco bovino deu-se devido a simbiose entre as espécies microbianas *Clostridium disporicum*, *Methanobacterium kanagiense*, *Pseudomonas stutzeri*, *Anaerobaculum mobile*, *Anaerobaculum hydrogeniformans*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus acidicola*, *Soehngenia saccharolytica* e membros não identificados do gênero *Peptoclostridium*. Dentro desse consórcio microbiano se destaca os gêneros: *Pseudomonas*, por ser detoxificante e existir exclusivamente só neste inóculo e aumentar consideravelmente sua abundância no final da produção de metano; *Alcaligenes* que também é detoxificante e aumentou consideravelmente sua abundância no final do ensaio; *Bacillus* com sua atividade degradadora de amido e celulose, que apesar da relativa baixa abundância, também aumentou consideravelmente no final do

ensaio. Logo em comparação com os outros inóculos o consórcio do inóculo com esterco bovino proporcionou a melhor decomposição da biomassa lignocelulósica, melhor potencial na degradação de inibidores e na utilização dos substratos gerados para produção biogás metano.

Nas figuras 8,9 e 10 são apresentados fluxogramas explicativos resumindo as atividades metabólicas dos gêneros presente em cada amostra tanto no início e no final da produção de biogás metano, onde os gêneros em negrito são os mais abundantes.

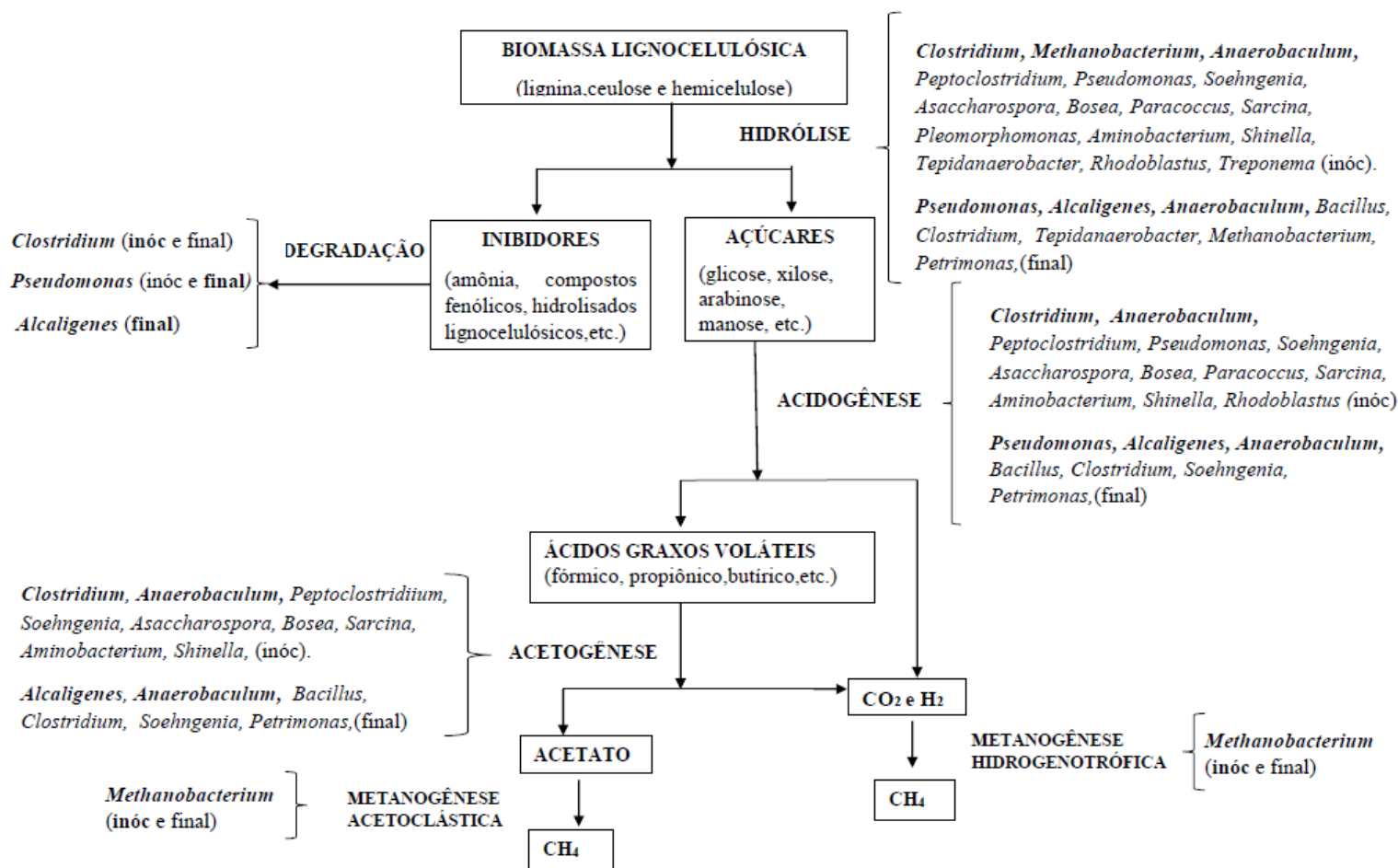


Figura 8: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no biorreator enriquecido com esterco bovino (UASB+FM). Os gêneros em negrito são os mais abundantes (fonte autoral).

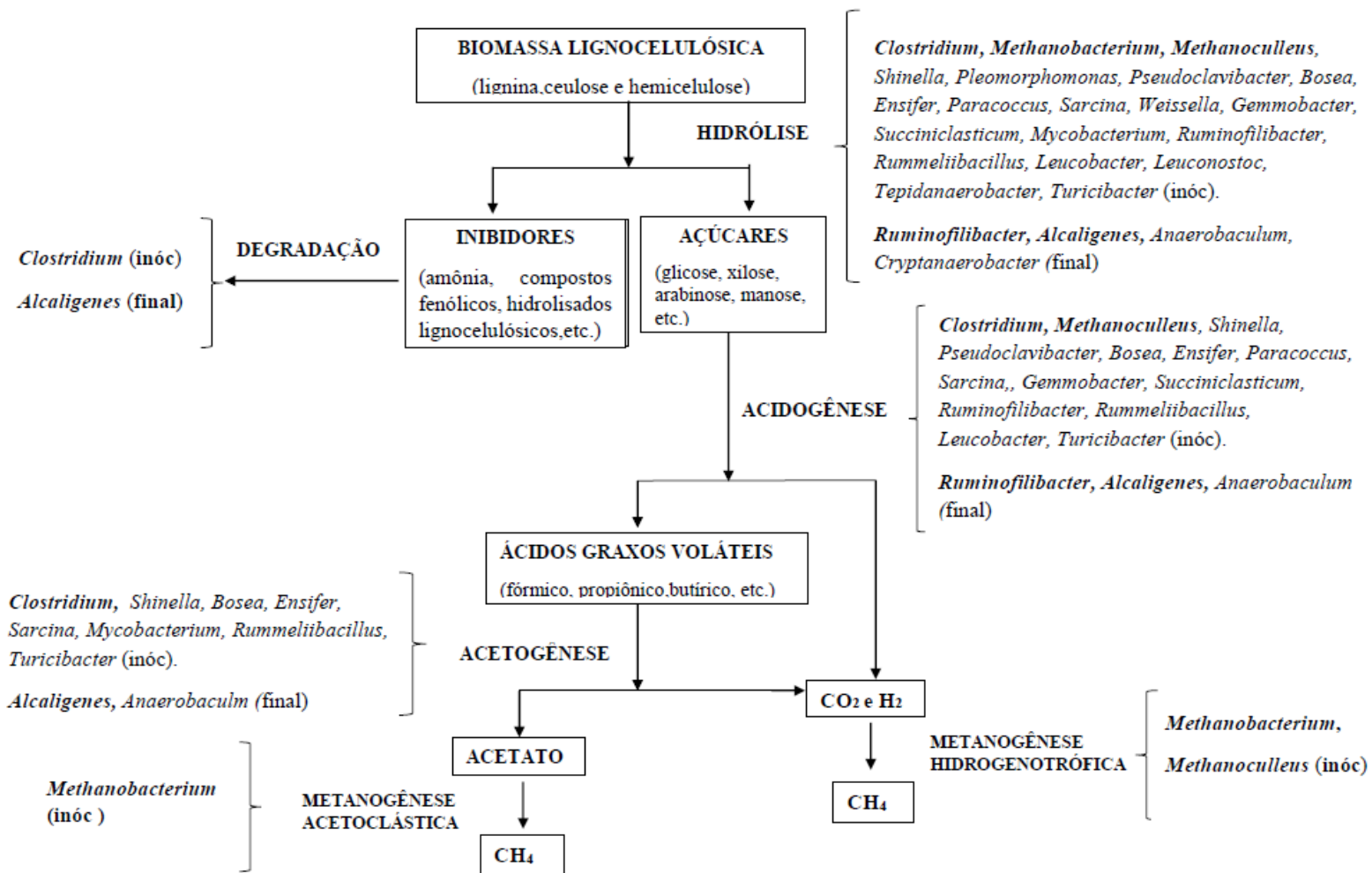


Figura 9: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no biorreator enriquecido com rúmen bovino (UASB+R). Os gêneros em negrito são os mais abundantes (fonte autoral).

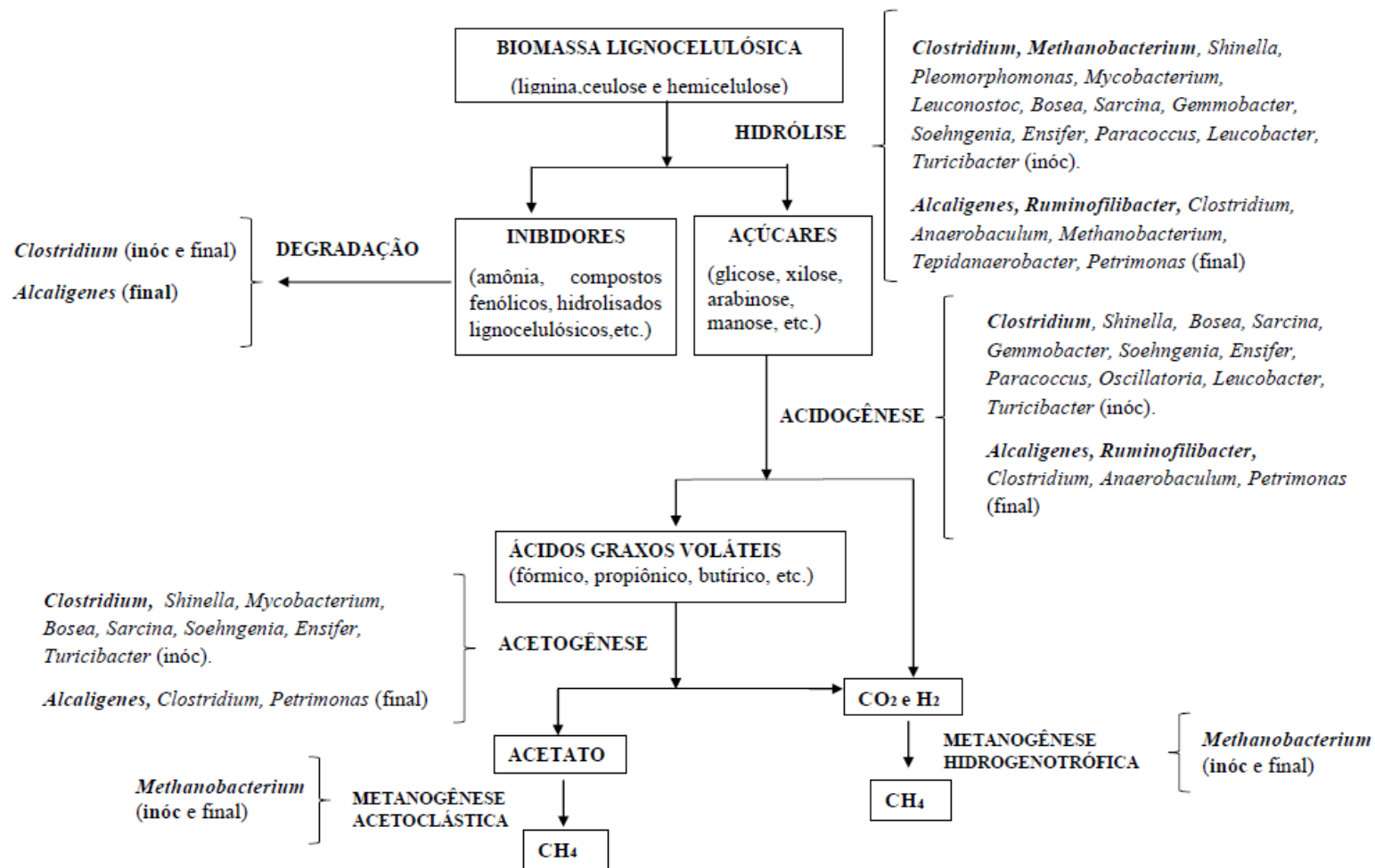


Figura 10: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no biorreator enriquecido somente com esgoto sanitário (UASB). Os gêneros em negrito são os mais abundantes (fonte autoral).

5.3 Comparação da comunidade microbiana dos gêneros com abundância relativa menor que 1 % no ensaio metanogênico (“Outros”)

O grupo denominado “outros” citado no ensaio metanogênico são os gêneros que foram identificados com abundância relativa percentual menor que 1% e/ou tão baixos que nos cálculos da abundância relativa se igualaram a 0%. Cada grupo de “outros” para cada amostra varia, como pode ser observado no *heatmap* na figura 26 no apêndice. Logo é importante comparar e observar se cada grupo de “outros” é diferente entre os reatores de forma a influenciar na produção de metano.

A quantidade de gêneros identificados com suas respectivas abundâncias define a diversidade de micro-organismos em cada amostra. Comparando as quantidades de gêneros presentes nos inóculos e amostras finais de cada reator apresentados nas figuras 4 e 5 (com abundância relativa percentual maior que 1%) com os gêneros com abundância relativa percentual menor que 1 % apresentados nos gráficos de pizza nas figuras 20 a 25, observa-se que o reator enriquecido com rúmen bovino, que teve menor produção de biogás metano, apresentou maior quantidade de gêneros, ou seja, maior diversidade do que os outros reatores.

Uma maior diversidade também pode levar a uma menor produção de biogás metano em relação aos outros reatores, como foi observado nesse estudo com o reator UASB+R, pois com mais variedade de micro-organismos, maior é a limitação e competição por substratos no meio. Assim algumas atividades podem ser inibidas ou desviadas para produção de outros compostos sem ser o biogás metano (Greening *et al.*, 2019). Outro ponto a ser observando no que tange a maior diversidade microbiana é a saturação de compostos tóxicos normalmente gerados por micro-organismos presentes nas amostras ou até mesmo a alteração da composição do meio de cultivo com células que morrem e liberam seu conteúdo intracelular no meio durante a fermentação (Chandel *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2008).

Observando-se o *heatmap* presente na figura 26 no apêndice, não foram encontrados gêneros com abundância relativa percentual igual a zero exclusivos da amostra inoc UASB+FM. Entretanto foram encontrados os gêneros com abundância relativa igual a 0% exclusivos na amostra final, meth UASB +FM: *Desulfovibrio*, *Dialister*, *Ensifer*, *Gemmobacter*, *Gordonia* e *Tetracoccus*. Entretanto, tais gêneros foram encontrados com

abundância relativa percentual baixa, com valores maiores que 0% e menores que 1 % nas amostras dos outros reatores, incluindo a amostra inicial inoc UASB +FM e no reator que obteve menor produção de metano, o UASB+R.

Sendo assim a alteração ou diminuição da abundância foi comum a todos os três reatores em abundâncias relativas baixas em valores muito próximos. Os que se diferenciaram já foram discutidos nos tópicos anteriores desse presente trabalho. Considerando que este estudo é comparativo, pode-se sugerir que essa alteração não foi decisiva para determinar a maior produção metano. Logo a melhor análise para determinar quais gêneros foram os determinantes na produção de metano é observar quais tiveram aumento ou diminuição na abundância no reator de maior produção de biogás (UASB +FM) paralelamente a alterações inversas, diminuições ou aumentos com grandes diferenças no valor em comum com os outros reatores. Tal tipo de análise foi apresentado nos tópicos anteriores.

Uma sugestão para próximos estudos pode-se realizar a digestão anaeróbia metanogênica somente com os gêneros do consórcio selecionado no penúltimo parágrafo do tópico 5.2.

5.4 Comparação da comunidade microbiana do inóculo anaeróbio enriquecidos com esterco bovino, com e sem tratamento térmico, para produção de hidrogênio

Os resultados discutidos a seguir se referem somente a amostra após o tratamento térmico sem a realização do ensaio de produção de produção de hidrogênio.

Foram detectadas no inóculo anaeróbio fortificado com esterco bovino sem tratamento térmico (inoc UASB+FM) 4027 sequências ou 12,98% do total da taxonomia encontrada nos ensaios. Já este mesmo inóculo tratado termicamente para promover uma maior produção de hidrogênio (inoc H₂ UASB + FM) revelou ter 7655 sequências correspondendo a 24,67% do total da taxonomia encontrada. Isso demonstra que o tratamento térmico realizado para remover micro-organismos consumidores de hidrogênio não reduziu a quantidade de sequências de gêneros da amostra e propiciou um aumento na quantidade de dos gêneros que não foram detectados na amostra sem tratamento térmico. Entretanto, observando o *heatmap* na figura 19 e a figura 11, as arqueias do gênero *Methanobacterium*, que possuem elevada abundância e utilizam gás hidrogênio para produzir metano foram eliminadas. Isso mostra que o tratamento térmico feito para otimizar a produção de biogás hidrogênio foi eficiente.

Observa-se no gráfico da figura 11 e também no *heatmap* apresentado na figura 19 no apêndice que a variedade dos gêneros no inóculo diminuiu com o tratamento térmico. Entretanto, como anteriormente citado, a quantidade de sequências identificadas aumentou demonstrando que a quantidade dos poucos gêneros presentes na amostra tratada termicamente era relativamente elevada.

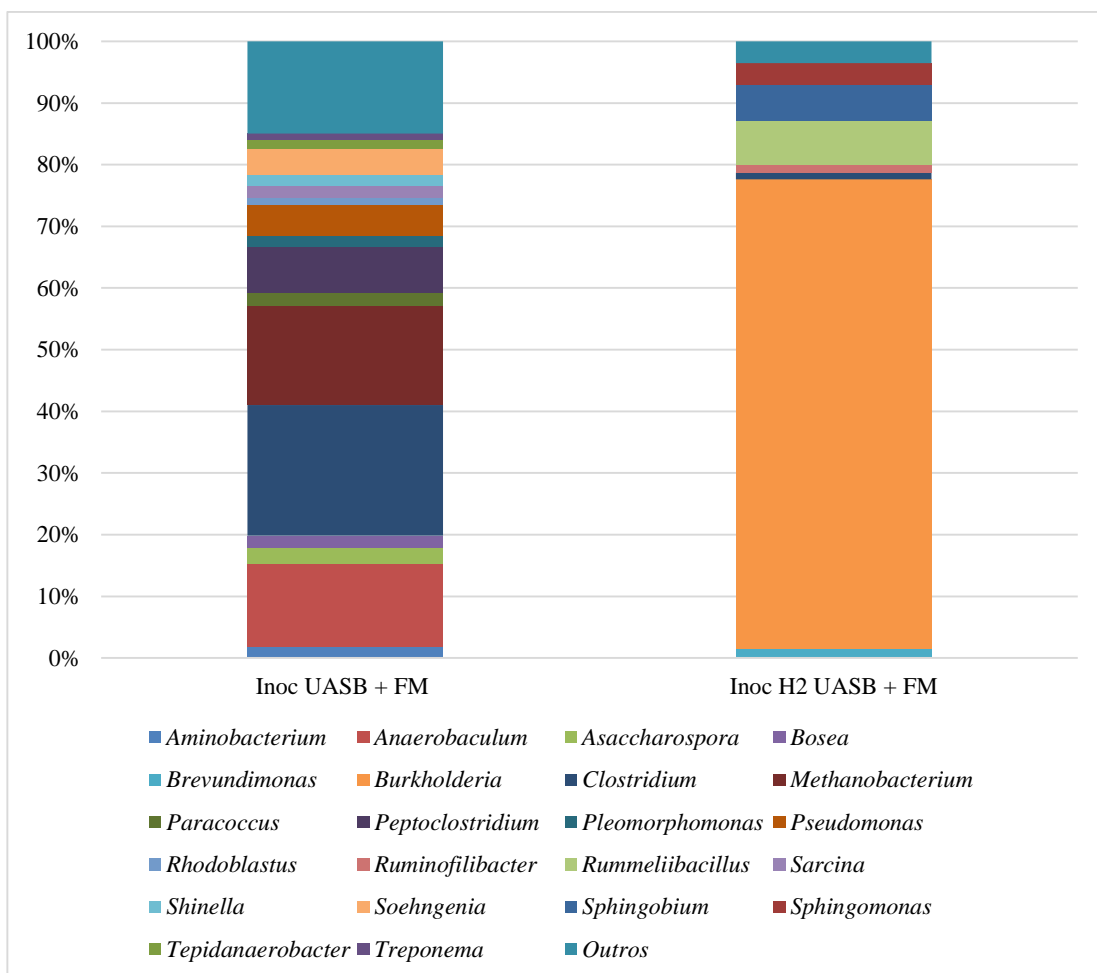


Figura 11: Abundância relativa percentual dos gêneros identificados nos inóculos sem e com tratamento térmico para produção de biogás hidrogênio.

Também observa-se o *heatmap* presente na figura 19 (Apêndice), o único gênero que sobreviveu ao tratamento térmico foi *Clostridium*, saindo de 22% em abundância para 1,11%. Isso pode ser explicado devido ao fato das bactérias desse gênero terem a capacidade de produzir esporos em condições extremas (Dürre, 2014; Shen *et al.*, 2019).

Os gêneros com abundância elevada como *Anaerobaculum*, *Peptoclostridium*, *Pseudomonas* e *Soehngenia* foram completamente eliminados com o tratamento térmico (figura 10).

Como evidenciado no *heatmap* da figura 19 (Apêndice) e no gráfico da figura 11 e destaca-se o enriquecimento do gênero *Burkholderia* com alta percentagem de abundância relativa com 76,21% de abundância.

Além do *Burkholderia* o pré tratamento propiciou o crescimento dos gêneros *Rummeliibacillus* (7,11%), *Sphingobium* (5,97%), *Sphingomonas* (5,42%), *Brevundimonas* (1,41%) e *Ruminofilibacter* (1,21%). Logo pode-se sugerir que reduzindo a competição entre os gêneros, a eliminação de alguns na amostra por meio do tratamento térmico propiciou o crescimento de outros.

Observa-se pela figura 12 que a atividade metanogênica foi completamente eliminada pelo tratamento térmico. Conseqüentemente teve-se um aumento da atividade acidogênica, responsável não só pela produção de ácidos mas também pela produção de biogás hidrogênio. As outras atividades, hidrolítica e acetogênica estão presentes em ambos os inóculos com semelhantes proporções.

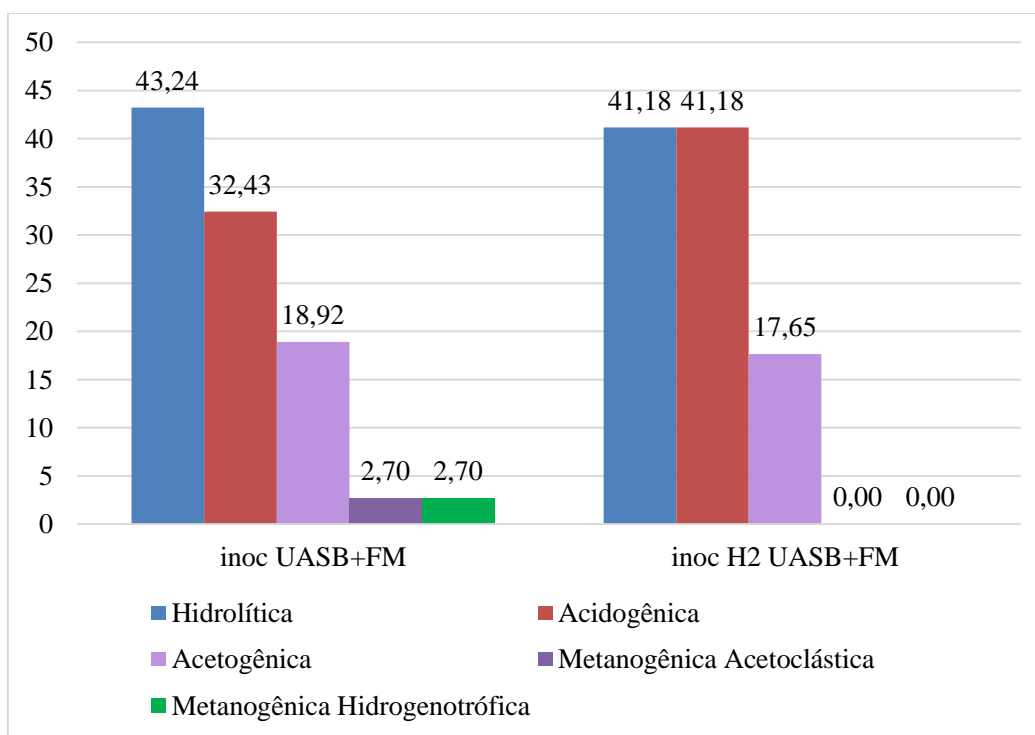


Figura 12: Gráfico comparativo das atividades metabólicas relativas presentes nos inóculos sem e com tratamento térmico para o ensaio de hidrogênio.

Foram feitas as seguintes considerações com as espécies detectadas de cada gênero citado anteriormente, apresentadas na figura 13.

Os gêneros produtores de hidrogênio encontrados no reator pré-tratado termicamente são: *Clostridium* (Bao *et al.*, 2012; Dürre, 2014; Yang *et al.*, 2019), *Brevundimonas* (Su *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019) e *Burkholderia* (Roumagnac *et al.*, 2012).

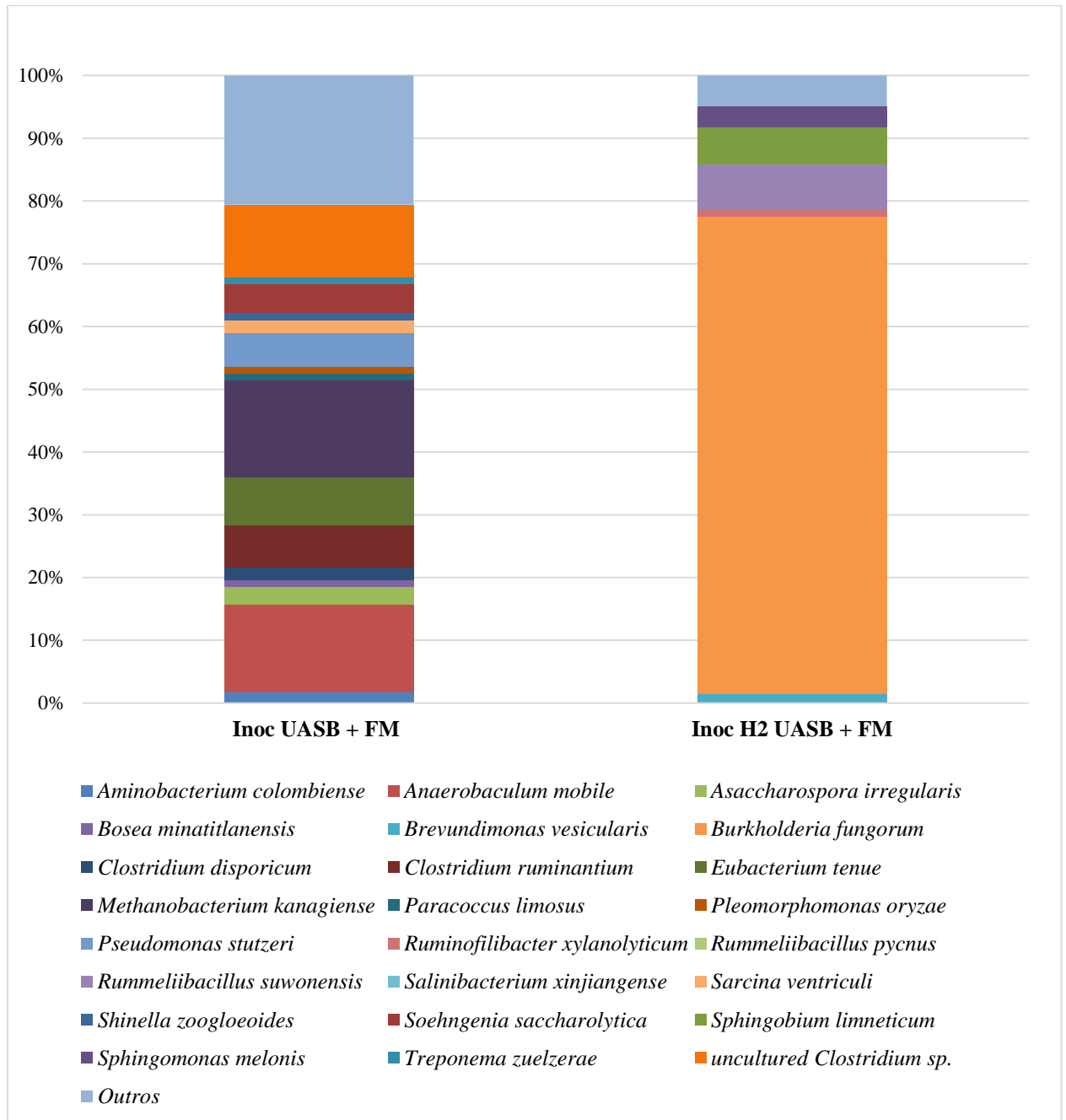


Figura 13: Abundância relativa percentual das espécies identificadas nos inóculos sem e com tratamento térmico para produção de biogás hidrogênio.

Como citado anteriormente, bactérias do gênero *Clostridium* têm a capacidade de produzir esporos, podendo sobreviver assim ao tratamento térmico além de produzir hidrogênio

(Bao *et al.*, 2012; Dürre, 2014; Shen *et al.*, 2019), além de também possuir atividades hidrolítica, acidogênica, acetogênica (Kanehisa *et al.*, 2021).

A espécie que predominou no inóculo tratado termicamente, *Burkholderia fungorum* possui atividade hidrolítica, acidogênica e acetogênica (Kanehisa *et al.*, 2021) podendo ser encontrada em simbiose com fungos lignolíticos (Coenye *et al.*, 2001), urina humana (Du *et al.*, 2021), esgotos industriais (Andreolli *et al.*, 2011 e Andreolli *et al.*, 2013) e em solos de minas (A.J. Feng *et al.*, 2017). Também tem a capacidade de resistir a ambiente ácidos e metabolizar metais pesados tóxicos a não tóxicos (X. X. Liu *et al.*, 2019; Akita *et al.*, 2019); de degradar e utilizar como fonte de energia hidrocarbonetos aromáticos policíclicos derivados da degradação da lignina em simbiose com fungos (Coenye *et al.*, 2001), como dibenzotiofeno, fenantreno, fluoreno, naftaleno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Andreolli *et al.*, 2011 e Andreolli *et al.*, 2013); e também de produzir hidrogênio (Roumagnac *et al.*, 2012). No caso do reator inoc H2 UASB+ FM, essa simbiose seria com micro-organismos que degradam a lignina como o gênero *Ruminofilibacter* (Baba *et al.*, 2019; Akita *et al.*, 2019) e *Rummeliibacillus* (Li *et al.*, 2019). Vale a pena mencionar que tal característica dá um potencial biotecnológico no uso da bactéria *Burkholderia fungorum* para biorremediação (Andreolli *et al.*, 2011 Akita *et al.*, 2019; Andreolli *et al.*, 2013 X. X. Liu *et al.*, 2019).

Já foi relatado que os gêneros *Rummeliibacillus* e *Clostridium* agem em sinergia para produção de biogás hidrogênio, aumentando a eficiência da utilização de carboidratos do meio. O primeiro gênero com sua ação celulolítica e de degradação de amido proporciona a produção de carboidratos mais simples que são utilizados pelo segundo para produzir hidrogênio (Yang *et al.*, 2019). Além disso, *Ruminofilibacter* e *Rummeliibacillus* possuem atividades hidrolítica, acidogênica, sendo este último gênero tendo além dessas atividade acetogênica (Kanehisa *et al.*, 2021).

O gênero *Sphingobium* possui atividades hidrolíticas e acidogênicas (tabela 4). A espécie encontrada no reator, *Sphingobium limneticum*, degrada hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e alifáticos, tolueno, meta e para-xileno (Park *et al.*, 2019), naftaleno e bifenil (Feng *et al.*, 2020). Espécies desse gênero possuem capacidade de resistir a ambientes com metais pesados e compostos tóxicos (Feng *et al.*, 2020).

Espécies do gênero *Sphingomonas*, incluindo a encontrada na amostra tratada termicamente, *Sphingomonas melonis*, possuem atividades hidrolíticas e acidogênicas (tabela

4). Além de degradar lignina e ligno-hemicelulose, este gênero também é capaz de degradar metais pesados, compostos aromáticos como bifenil, furano clorado, estradiol, polietileno glicol, diferentes tipos de herbicidas e pesticidas, o que faz deste gênero interessante para biorremediação (Asaf *et al.*, 2020).

Espécies do gênero *Brevundimonas* possui atividades hidrolíticas e acidogênicas (Kanehisa *et al.*, 2021) e são conhecidas pela alta eficiência na produção de hidrogênio (Su *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2019). E essa eficiência pode ser aumentada quando esse gênero é co-cultivado com gêneros que degradam amido *ou* outras fontes de carbono que também produzem hidrogênio como o *Bacillus*, aumentando a disponibilidade de substratos a serem convertidos a hidrogênio (Bao *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2019). *Brevundimonas vesicularis* é conhecida por ter potencial de biorremediação de hidrocarbonetos poliaromáticos (Ryan *et al.*, 2018).

A figura 14 apresenta um fluxograma resumindo as atividades metabólicas dos gêneros presentes no inóculo enriquecido com esterco bovino termicamente tratado para produção de biogás hidrogênio (inoc H2 UASB+FM), onde os gêneros em negrito são os mais abundantes.

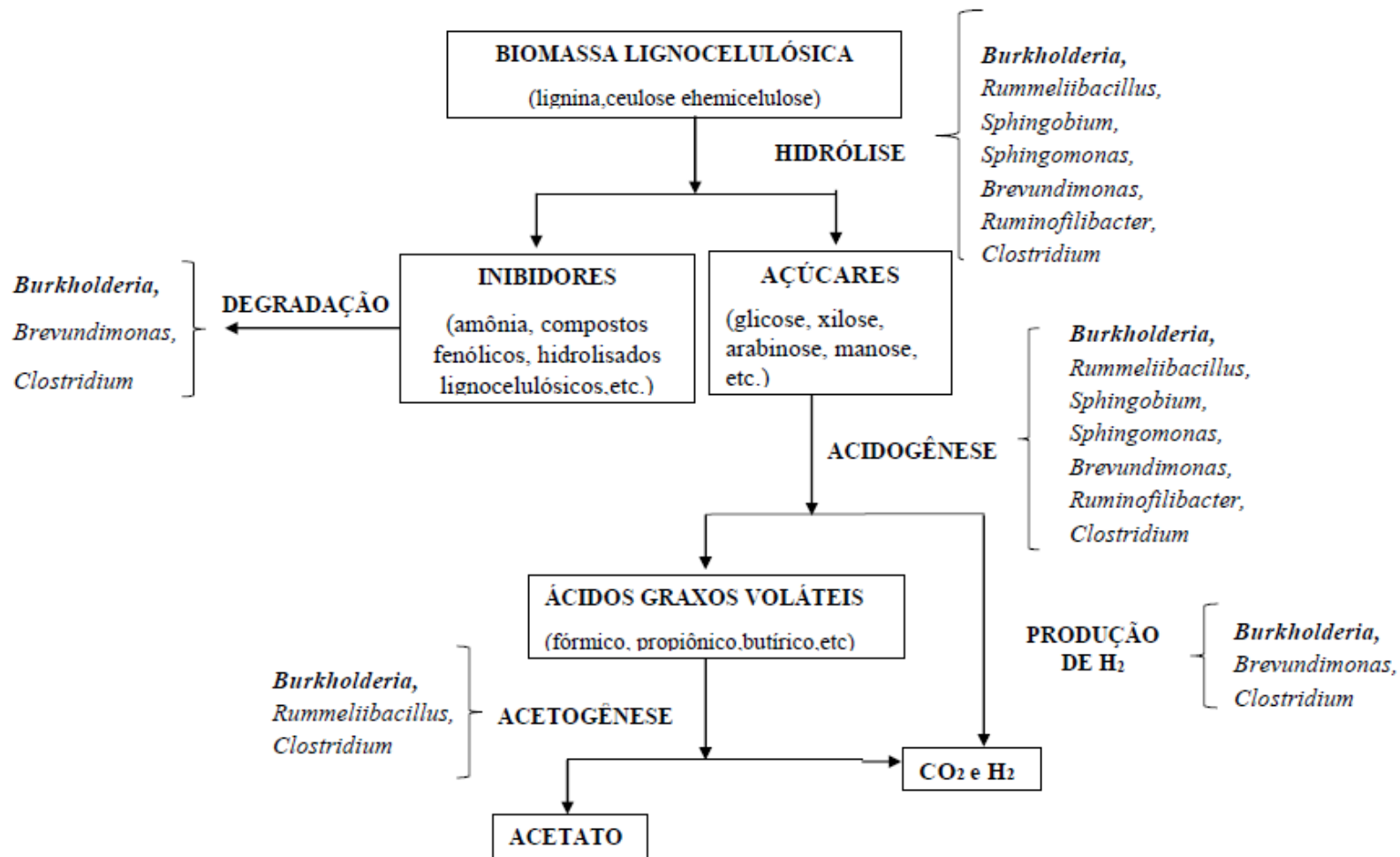


Figura14: Fluxograma explicativo das atividades metabólicas dos gêneros presente no inóculo biorreator enriquecido com esterco bovino termicamente tratado para produção de biogás hidrogênio (inoc H₂ UASB+FM). Os gêneros em negrito são os mais abundantes (fonte autoral).

6 CONCLUSÃO

Considerando a comparação das comunidades microbianas dos diferentes inóculos utilizados para a produção de metano a partir do bagaço de cana-de-açúcar, conclui-se que o melhor desempenho do inóculo anaeróbico UASB acrescido de esterco bovino deu-se devido a simbiose entre as espécies microbianas *Clostridium disporicum*, *Methanobacterium kanagiense*, *Pseudomonas stutzeri*, *Anaerobaculum mobile*, *Anaerobaculum hydrogeniformans*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus acidicola*, *Soehngenia saccharolytica* e membros não identificados do gênero *Peptoclostridium*. . Dentro desse consórcio microbiano se destaca os gêneros exclusivos desse biorreator: *Pseudomonas* que aumentou consideravelmente sua abundância no final da produção de metano; e *Bacillus*, com sua atividade degradadora de amido e celulose, que apesar da relativa baixa abundância, também aumentou consideravelmente no final do ensaio. Outro destaque se dá a espécie *Alcaligenes faecalis*, capaz de remover biogás metano do meio e está em menor abundância nessa amostra. Logo suas atividades metabólicas proporcionaram a melhor decomposição da biomassa lignocelulósica, ação contra inibidores e uso dos substratos gerados para produção biogás metano. Os micro-organismos que estavam ausentes ou pouco abundantes nos inóculos foram: *Aminobacterium*, *Asaccharospora*, *Bosea*, *Ensifer*, *Gemmobacter*, *Leucobacter*, *Leuconostoc*, *Methanoculleus*, *Mycobacterium*, *Oscillatoria*, *Paracoccus*, *Peptoclostridium*, *Pleomorphomonas*, *Pseudoclavibacter*, *Rhodoblastus*, *Rummeliibacillus*, *Sarcina*, *Shinella*, *Succiniclasticum*, *Treponema*, *Turicibacter* e *Weissella*. O tratamento térmico realizado no inóculo UASB-FM para produção de hidrogênio foi eficiente na remoção de arqueias como também de espécies que estavam abundantes no meio antes do tratamento: *Anaerobaculum*, *Peptoclostridium*, *Pseudomonas* e *Soehngenia*. Dentre os gêneros detectados após o tratamento foram: *Burkholderia* (mais abundante), *Rummeliibacillus*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Brevundimonas*, *Ruminofilibacter* e *Clostridium*. Somente o gênero *Clostridium* foi detectado antes e depois do tratamento, os outros foram detectados somente após. Os gêneros produtores de hidrogênio e detoxificantes nesse consórcio foram são e *Burkholderia*, *Brevundimonas* e *Clostridium*.

REFERÊNCIAS

Abo, B.O.; Gao, Ming; Wang, Yonglin; Wu, Chuanfu ; Ma, Hongzhi ; Wang, Qunhui. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. *Reviews on Environmental Health*, 34(1):57-68. 26 Mar 2019.

Abreu, E.F. Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores uasb tratando esgoto sanitário. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-graduação em Saneamento Meio Ambiente e Recursos Hídricos). 2007. 105 f., Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte. 2007.

Akita, Hironaga; Kimura, Zen-ichiro; Zulkhairi, Mohd; Yusof, Mohd; Nakashima, Nobutaka; Hoshino, Tamotsu. Identification and characterization of *Burkholderia multivorans* CCA53. *Biomed Central (BMC) Research Notes* 10:249. 2019.

Andreolli, Marco; Lampis, Silvia; Zenaro, Elena.; Salonen, M.S.; Vallini, Giovanni. *Burkholderia fungorum* DBT1: a promising bacterial strain for bioremediation of PAHs-contaminated soils. *Federation of European Microbiological Societies (FEM), Microbiology Letters* 319, 11-18. Mar 2011.

Arelli, V.; Mamindlapelli; N. K.; Juntupally, S.; Begum, S.; Anupoju, G. R. Solid-state anaerobic digestion of sugarcane bagasse at different solid concentrations: Impact of bio augmented cellulolytic bacteria on methane yield and insights on microbial diversity. *Bioresource Technology*, 340, 125675. Jul 2021.

Asaf, Sajjad; Numan, Muhammad; Khan, A. L.; & Al-Harrasi, Ahmed. *Sphingomonas*: from diversity and genomics to functional role in environmental remediation and plant growth. *Critical Reviews in Biotechnology*, vol 40 issue 2. 06 Jan 2020.

Baba, Yasunori ; Matsuki, Yu ; Takizawa, Shuhei; Suyama, Yoshihisa ; Tada, Chika ; Fukuda; Saito, Masanori; Nakai, Yutaka. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass with Cattle Rumen Fluid for Methane Production: Fate of Added Rumen Microbes and Indigenous Microbes of Methane Seed Sludge. *Microbes and Environments*. Vol. 34, No. 4, 421-428. 2019.

Bao, Meidan; Su, Haijia ; Tan, Tianwei. Biohydrogen Production by Dark Fermentation of Starch Using Mixed Bacterial Cultures of *Bacillus sp* and *Brevumdimonas sp*. *Energy and Fuels*, 26, 5872–5878.2012.

Brar, Amandeep; Kumar, Manish; Singh,R.P.; Vivekanand, V; Pareeka, Nidhi. .Phycoremediation coupled biomethane production employing sewage wastewater: Energy balance and feasibility analysis .*Bioresource Technology* , vol 308, 123292. Jul 2020.

Bräsen, Christopher; Esser, Dominik; Rauch, Bernadette; Siebers, Bettina. Carbohydrate Metabolism in Archaea: Current Insights into Unusual Enzymes and Pathways and Their Regulation. *American Society for Microbiology (ASM), Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol 78, n 1. Mar 2014.

Byrne, Eoin; Kovacs, Krisztina; Niell, E.W.J.V.; Willquist, Karin; Svensson, S.E.; Kreuger, Emma. Reduced use of phosphorus and water in sequential dark fermentation and anaerobic digestion of wheat straw and the application of ensiled steam-pretreated lucerne as a macronutrient provider in anaerobic digestion. *Biotechnology for Biofuels*, 11:281. 11 Out 2018.

Carpio, L.G.T.; Souza, F.S. Competition between Second-Generation Ethanol and Bioelectricity using the Residual Biomass of Sugarcane: Effects of Uncertainty on the Production Mix. *MDPI, Molecules*, 24(2):369.. 21 Jan 2019.

Chandel, A.K.; Silva, S.S.; Singh, O.V. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*. Set 2011.

Chen, Y.; Cheng, J. J.; Creamer, K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresource Technology*, vol 99, issue 10, p. 4044–4064.Jul 2008.

Christoff, A.P.; Cruz,G.N.F; Sereia, A.F.R.; Yamanaka,L.E.; Silveira,P.P.; Oliveira,L.F.V. End-to-end assessment of fecal bacteriome analysis: from sample processing to DNA sequencing and bioinformatics results.*Neoprospecta Microbiome Technologies*.19 de Maio 2019.

Christoff, A.P.; Sereia, A.F.R.; Boberg, D.R.; Moraes, R.L.V.; Oliveira, L.F.V. Bacterial identification through accurate library preparation and high-throughput sequencing. Neoprosecta Microbiome Technologies, AS. 25 May 2017.

Coenye, Tom; Laevens, Severine; Willems, Anne; Ohlén, Maria; Hannant, Wendy; Govan, J.R.W.; Gillis, Monique; Falsen, Enevold; Vandamme, Peter. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 1099–1107. 2001.

Dang, J.; Wang, N.; Atiyeh, H.K. Review of Dissolved CO and H₂ Measurement Methods for Syngas Fermentation. Sensors, 21, 2165. 2021

Delforno, T. P.; Júnior, G. V. L.; Garcia, I. N.S.; Okada, D. Y.; Macedo, T. Z.; Varesche, M. B. A.; Oliveira, V. M. Metagenomic analysis of the microbiome in three different bioreactor configurations applied to commercial laundry wastewater treatment. Science of The Total Environment, 587-588, 389–398. 2017.

Delforno, T. P.; Júnior, G. V. L.; Noronha, M. F.; Sakamoto, I. K.; Varesche, M. B. A.; Oliveira, V. M. Microbial diversity of a full-scale UASB reactor applied to poultry slaughterhouse wastewater treatment: integration of 16S rRNA gene amplicon and shotgun metagenomic sequencing. Wiley, Microbiology Open, 6(3).2016.

Deng, Yuying; Huang, Zhenxing; Ruan, Wenquan; Miao, Hengfeng; Shi, Wansheng; Zhao, Mingxing. Enriching ruminal polysaccharide-degrading consortia via co-inoculation with methanogenic sludge and microbial mechanisms of acidification across lignocellulose loading gradients. Applied Microbiology and Biotechnology, 102:3819–3830. 6 Mar 2018.

Dong, Lili; Cao, Guangli; Guo, Xianzhang; Liu, Tianshu; Wu, Jiwen; Ren, Nanqi. Efficient biogas production from cattle manure in a plug flow reactor: A large scale long term study. Science Direct, Bioresource Technology 278, 450–455.2019.

Du, Mingmei; Song, Linjian; Wang, Yan; Suo, Jijiang; Bai, Yanling ; Xing, Yubin; Xie, Lijun; Liu Bowei; Li, Lu; Yanping, Luo; Yunxi,Liu. Investigation and control of an outbreak of urinary tract infections caused by *Burkholderia cepacian*-contaminated anesthetic gel. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 10:1. 2021

Dürre, Peter. Physiology and Sporulation in Clostridium.American Society for Microbiology Press, Microbiology Spectrum vol. 2 no. 4 .8 Ago 2014.

Elizondo, S.E.; Maldonado, Juan; Brown, R.K. Anaerobic carbon monoxide metabolism by Pleomorphomonas carboxyditropha sp. nov., a new mesophilic hydrogenogenic carboxydotroph. FEMS Microbiology Ecology, 94, 2018.

Embree, Mallory; Liu, J.K.; Al-Bassam, M.M.; Zengler, Karsten. Networks of energetic and metabolic interactions define dynamics in microbial communities. PNAS, vol. 112 no. 50, 15451. 15 Dez 2015.

Felestrino,E.B; Sanchez, A.B.; Caneschi ,W.L.; Lemes, C.G.d.C.; Assis, R.d.A.B.; Cordeiro, I.F. Complete genome sequence and analysis of *Alcaligenes faecalis* strain Mc250, a new potential plant bioinoculant. PLoS ONE 15(11).5 novembro 2020.

Feng, A.J.; Xiao, Xi; Ye, C. C.; Xu X. M.; Zhu , Qing ; Yuan,J. P.; Hong,Y. H.; Wang J.H. Isolation and characterization of *Burkholderia fungorum* Gan-35 with the outstanding ammonia nitrogen-degrading ability from the tailings of rare-earth-element mines in southern Jiangxi, China. Springer, AMB Express 7:40. 2017.

Feng, G. D.; Wang,Q. B.; Zhang, X. J.; Chen, W.D.; Li, J.L.; Zhu,H.H. *Sphingobium paulinellae* and *Sphingobium algicola* Lee and Jeon 2017 are two later heterotypic synonyms of *Sphingobium limneticum* Chen *et al.* 2013 and emended description of the species. Microbiology Society, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol 70 issue 3.7 Jan 2020.

FINEP. PAISS. Disponível em: <<http://www.finep.gov.br/apoio-e-financiamento-externa/historico-de-programa/programas-inova/paiss>>. Acesso em 26 out 2021.

Greening, Chris ; Geier, Renae; Wang, Cecilia; Woods, L.C.; Morales, S.E.; McDonald, M.J.; Green, R.R.; Morgan, X.C.; Koike, Satoshi; Leahy, S.C.; Kelly, W.J.; Cann, Isaac; Attwood, G.T.; Cook, G.M.; Mackie, R.I. Diverse hydrogen production and consumption pathways influence methane production in ruminants . *The ISME Journal*, 13:2617–2632. 26 Jun 2019.

Grinsven, S.V.; Damsté, J.S.S.; Asbun, A.A.; Engelmann, J.C.; Harrison, John; Villanueva, Laura. Methane oxidation in anoxic lake water stimulated by nitrate and sulfate addition. *Environmental Microbiology*, vol 22 issue 2, p. 766–782 .2020.

Gylswyk, N. O. V. *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a Ruminant Bacterium Converting Succinate to Propionate as the Sole Energy-Yielding Mechanism. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 45, issue 2. 1 Abr 1995.

Ince, Orhan; Akyol, Çagr ;Ozbayram, E.G.; Tural, Bilgesu; Ince, Bahar. Enhancing methane production from anaerobic co-digestion of cow manure and barley: Link between process parameters and microbial community dynamics. *Environmental Progress & Sustainable Energy*.2019.

Jensen, M.A.; Balzarotti, Riccardo; Thomsen, S.T.; Fonseca, César; Kádár, Zsófia. Combined ensiling and hydrothermal processing as efficient pretreatment of sugarcane bagasse for 2G bioethanol production. *Biotechnology of Biofuels*, 11:336. 20 Dez 2018.

Júnior, S.V. Sugarcane-Biorefinery. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 166:125-136. 2017.

Junginger, H.M.; Moulin, T.M.; Daioglou, Vassilis; Fritsch, Uwe; Guisson, Ruben; Hennig, Christiane; Thrän, Daniela; Heinimö, Jussi ; Hess, J.R.; Lamers, Patrick; Li, Chenlin; Kwant, Kees; Olsson, Olle; Proskurina, Svetlana; Ranta, Tapio; Wild, Michael. The future of biomass and bioenergy deployment and trade: a synthesis of 15 years IEA Bioenergy Task 40 on sustainable bioenergy trade. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol 13, issue 2, p. 247–266. 12 Mar 2019.

Junqueira, T.L.; Chagas, M.F.; Gouveia, V.L.R.; Rezende, M.C.A.F., Watanabe, M.D.B.; Jesus, C.D.F.; Cavalett, Otavio; Milanez, A.Y.; Bonomi, Antonio. Techno-economic analysis

and climate change impacts of sugarcane biorefineries considering different time horizons .
Biotechnology for Biofuels, vol. 10, no.50.2017.

Kanehisa *et al.* Kyoto Encyclopedia at Genes and Genomes (KEGG). KEGG Pathway Database. Kanehisa Laboratories. Disponível em: < <https://www.genome.jp/kegg/>>. Acesso em Out de 2021.

Kesik, M.; Blagodatsky,S.; Papen H. ; Bahl K.B. Effect of pH, temperature and substrate on N₂O, NO and CO₂ production by *Alcaligenes faecalis* p. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology. 12 Jun 2006.

Kim, S. I.; Kim, Eunji ; Aghasa, Aghasa; Hwang, Seokhwan. Shift in bacterial diversity in acidogenesis of gelatin and gluten seeded with various anaerobic digester inocula. Science Direct, Bioresource Technology, vol 396, 123158. 2020.

Kim,S.Y.; Pramanik, Prabhat; Bodelier, P.L.E; Kim, P.J. Cattle Manure Enhances Methanogens Diversity and Methane Emissions Compared to Swine Manure under Rice Paddy. PLoS ONE 9, 12. 10 dez 2014.

Kitamura, Koji; Fujita, Takashi; Akada, Shinji; Tonouchi, Akio. *Methanobacterium kanagiense* sp. nov., a hydrogenotrophic methanogen, isolated from rice-field soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61, 1246–1252.2011.

Koupaie, E.H.; Dahadha, S.; Lakeh, A.A.B.; Azizi, A.; Elbeshbishy, E.Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. Journal of Environmental Management, vol 233, p. 774-784. Elsevier.Science Direct. Mar 2019.

Krzmarzick, M.J.; Taylor,D.K.; Fu, Xiang; McCutchan,A.L. Diversity and Niche of Archaea in Bioremediation.Archaea, vol 2018.3 September 2018.

Kucharska, Karolina; Rybarczyk, Piotr; Hołowacz, Iwona; Łukajtis , Rafał; Glinka, Marta; Kaminski , Marian. Pretreatment of Lignocellulosic Materials as Substrates for Fermentation Processes.MDPI, Molecules, 23(11):2937. 10 Nov 2018.

Lalucat, Jorge; Bennasar, Antoni; Bosch, Rafael; García-Valdés ,Elena; Palleroni, N. J. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. American Society for Microbiology, Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 70, 510–547, No. 2 .June 2006.

LaMartina, E.L.; Mohaimani, A.A.; Newton, R.J. Urban wastewater bacterial communities assemble into seasonal steady states. Microbiome, 9:116. 2021.

Leite, A.; Janke, L.; Lv, Z.; Harms, H.; Richnow, H.-H.; Nikolausz, M. Improved Monitoring of Semi-Continuous Anaerobic Digestion of Sugarcane Waste: Effects of Increasing Organic Loading Rate on Methanogenic Community Dynamics. International Journal of Molecular Sciences, 16(10), 23210–23226.2015.

Li, Min ; Li, Yao; Fan, Xiaojun; Qin, Yuhong; He, Yongji ; Lv, Yongkang. Draft Genome Sequence of *Rummeliibacillus sp.* Strain TYF005, a Physiologically Recalcitrant Bacterium with High Ethanol and Salt Tolerance Isolated from Spoilage Vinegar. American Society for Microbiology. Microbiology Resource Announcements. volume 8 issue 31. Agosto 2019.

Li, Yu; Zhao, Jing; Krooneman, Janneke; Euverink, G. J. W. Strategies to boost anaerobic digestion performance of cow manure: Laboratory achievements and their full-scale application potential. Elsevier, Science of the Total Environment 755, 142940. 2020.

Lima, D.R.S. Avaliação de rotas tecnológicas para o aproveitamento energético do bagaço de cana-de-açúcar. Tese de doutorado (Pós-Graduação em Engenharia Ambiental). 2018. 276 f., Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto. 2018.

Lin, Qiang; He, Guihua; Rui, Junpeng; Fang, Xiaoyu; Tao, Yong; Li, Jiabao; Li, Xiangzhen . Microorganism-regulated mechanisms of temperature effects on the performance of anaerobic digestion. Microbial Cell Factories, 15:96. 2016.

Mainardis, Matia; Buttazzoni, Marco; Goi, Daniele. Up-Flow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Technology for Energy Recovery: A Review on State-of-the-Art and Recent Technological Advances. Bioengineering (Basel), 7(2): 43. Jun 2020.

Manzoor,Shahid; Schnürer, Anna; B.R., Erik; Müller, Bettina .Complete genome sequence of *Methanoculleus bourgensis* strain MAB1, the syntrophic partner of mesophilic acetate-oxidising bacteria (SAOB). *Standard in Genomics and Sciences*, vol 11 :80. 2016.

Mavromatis, Konstantinos; Stackebrandt, Erko; Held, Brittany; Lapidus, Alla; Nolan, Matt; Lucas, Susan; Hammon, Nancy; Deshpande,Shweta; Cheng, Jan-Fang; Tapia, Roxanne; Goodwin, L. A.; Pitluck, Sam; Liolios,Konstantinos; Pagani, Ioanna; Ivanova , Natalia ; Mikhailova, Natalia; Huntemann, Marcel; Pati, Amrita; Chen, Amy; Palaniappan, Krishna; Land, Miriam; Rohde, Manfred; Spring, Stefan; Göker, Markus; Woyke, Tanja; Detter, J. C.; Bristow, James; Eisen, J.A.; Markowitz, Victor; Hugenholtz, Philip; Klenk, H.P.; Kyrpides, N.C. Complete genome sequence of the moderate thermophile *Anaerobaculum mobile* type strain (NGAT) . *Standards in Genomic Sciences* , 8:47-57. 2013.

Mehta, D.; Satyanarayana, T. Bacterial and Archaeal α -Amylases: Diversity and Amelioration of the Desirable Characteristics for Industrial Applications. *Frontiers in Microbiology*, 7. 2016.

Mei, Ran; Nobu M.K. , Liu ,W. T. Identifying anaerobic amino acids degraders through the comparison of short-term and long-term enrichments. *Environmental Microbiology Reports*, vol 12 issue 2, 173-184. Abril 2020.

Menegatto, M.B.S. Avaliação do potencial celulolítico e fermentativo de bactérias do gênero *Clostridium* e da microbiota autóctone na fermentação do bagaço de cana bruto.Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial). 2019. 75 f., Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Ouro Preto. 2019.

Miltner, Angela; Wukovits, Walter; Pröll, Tobias; Friedl, Anton. Renewable hydrogen production: a technical evaluation based on process simulation. *Journal of Cleaner Production*, vol. 18, suplemento 1, p.S51-S62. Dez 2010.

Monlau, F.; Barakat, A.; Trably, E.; Dumas, C.; Steyer, J.P.; Carrère, H. Lignocellulosic Materials Into Biohydrogen and Biomethane: Impact of Structural Features and Pretreatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3), 260–322. 2013.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acessado em Out 2021.

Nishio, Takayuki; Yoshikura, Taro; Mishima, Hirotsugu; Inouye, Zensuke; Itoh, Hisao. Conditions for nitrification and denitrification by an immobilized heterotrophic nitrifying bacterium *Alcaligenes faecalis* OKK17. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1998.

Nuansawan, Nararatchporn; Witthayaphirom, Chayanid; Shoda, Makoto. Reduction of Methane and Nitrous Oxide from High Strength Municipal Solid Waste Leachate by Sequencing Batch Reactor with *Alcaligenes faecalis* No.4. *Thai Environmental Engineering Journal* Vol. 34 No. 1 (2020) : 27-34.

Oliveira, C.C.N.; Rochedo, P.R.R.; Bhardwaj, Rajat; Worrell, Ernst; Szklo, Alexandre. Bio-ethylene from sugarcane as a competitiveness strategy for the Brazilian chemical industry. *Modeling and Analysis, Biofuels, Bioproducts and Biorefining* vol 14, issue 2, p. 286-300. 9 dez 2019.

Oliveira, C.C.N.; Angelkorte, Gerd; Rochedo, P.R.R.; Szklo, Alexandre. The role of biomaterials for the energy transition from the lens of a national integrated assessment model. *Climatic Change* 167(3-4):57. 10 Ago 2021.

Osman, A.I.; Deka, T.J., Baruah, D.C.; Rooney, D.W. Critical challenges in biohydrogen production processes from the organic feedstocks. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 14 Ago 2020.

Ozbayram, E.G.; Ince, Orhan; Ince, Bahar; Harms, Hauke ; Kleinstauber, Sabine. Comparison of Rumen and Manure Microbiomes and Implications for the Inoculation of Anaerobic Digesters. *Microorganisms*. 14 de fev 2018.

Pan, J.; Wang, X.; Cao, A.; Zhao, G.; Zhou, C. Screening methane-oxidizing bacteria from municipal solid waste landfills and simulating their effects on methane and ammonia reduction. *Environmental Science and Pollution*, 26(36):37082-37091. Set 2019.

Park, Y. J.; Kim, K. H.; Han, D. M.; Lee, D. H.; Jeon, C. O. *Sphingobium terrigena* sp. nov., isolated from gasoline contaminated soil. *Microbiology Society, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 9 issue 8. Ago 2019.

Parshina,S.N.; Kleerebezem, Robbert; Sanz,J.L.; Lettinga, Gatzte; Nozhevnikova, A.N.; Kostrikina, N.A.; Lysenko,A.M.; Stams, A.J.M. *Soehngenia saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Clostridium amygdalinum* sp. nov., two novel anaerobic, benzaldehyde-converting bacteria. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1791–1799. 2003.

Pathak, Ashish; Stothard, Paul ; Chauhan , Ashvini. Comparative Genomic Analysis of Three *Pseudomonas* Species Isolated from the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) Tissues, Mantle Fluid, and the Overlying Estuarine Water Column. MDPI, Microorganisms, 9,490. 27 Fev 2021.

Peña, C.; Castillo, T.; García, A.; Millán, M.; Segura, D. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. Microbial Biotechnology, 7(4), 278–293. 2014.

Prakash, Jyotsana; Sharma,Rakesh; Patel1, S.K.S; Kim,I.W; Kalia,V.C. Bio-hydrogen production by co-digestion of domestic wastewater and biodiesel industry effluent. PLOS ONE 13(7): Jul 2018.

Puyol, D., Batstone, D. J., Hülsen, T., Astals, S., Peces, M.; Krömer, J. O. Resource Recovery from Wastewater by Biological Technologies: Opportunities, Challenges, and Prospects. Frontiers in Microbiology, 7. Jan 2017.

Qiana, Mingyu; Lia, Yeqing; Zhanga, Yixin; Suna, Ziyang; Wang Ying; Fengd,Jing; Yao, Zonglu; Zhaod. Lixin. Efficient acetogenesis of anaerobic co-digestion of food waste and maize straw in a HSAD reactor. Bioresource Technology vol283, p. 221-228. Jul 2019.

Raimondi, Stefano; Musmeci, Eliana; Candelieri, Francesco; Amaretti,Alberto; Rossi, Maddalena. Identifcation of mucin degraders of the human gut microbiota. Nature, Scientific Repoorts, 11:11094. 2021

Roumagnac, P.; Richaud, P.; Barakat, M.; Ortet, P.; Roncato, M.-A.; Heulin, T.; Cournac, L. Reversible oxygen-tolerant hydrogenase carried by free-living N₂-fixing bacteria isolated from the rhizospheres of rice, maize, and wheat. MicrobiologyOpen, 1(4), 349–361.Ago 2012.

Rusmanis, Davis; O'Shea, Richard; Wall, D.M.; Murphy, J.D. Biological hydrogen methanation systems – an overview of design and efficiency .Bioengineered, vol. 10, no. 1, 604–634.17 Out 2019.

Ryan,M.P.; Pembroke, J.T. Brevundimonas spp: Emerging global opportunistic pathogens. Virulence, 9:1, 480-493. 2018.

Schumacher, Britt; Zerback, Timo, Wedwitschka, Harald; Weinrich, Sören; Hofmann, Josephine; Nelles, Michael. The Influence of Pressure-Swing Conditioning Pre-Treatment of Cattle Manure on Methane Production. Bioengineering, 7(1), 6.2019.

Sharma, Archana ; Satyanarayana, T. Characteristics of a High Maltose-Forming, Acid-Stable, and Ca²⁺-Independent α -amylase of the Acidophilic *Bacillus acidicola*. Springer, Applied Biochemistry Biotechnology, 171:2053–2064.11 Set 2013.

Shen, Aimee; Edwards, A.N.; Sarker, M. R.; Sabja D. P. Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens. Microbiology Spectrum. vol. 7 no. 6.23 Dez 2019.

Soni, S.K.; Sharma, Amita; Soni, Raman. Cellulases: Role in Lignocellulosic Biomass Utilization. Cellulases, Springer Protocols Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1796.1 Jun 2018.

Suzuki, Sho; Shintani, Masaki; Sanchez,Z.K.; Kimura, Kohei ; Numata, Mitsuru; Yamazoe,Atsushi; Kimbara, Kazuhide. Effects of phosphate addition on methane fermentation in the batch and upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. Applied Microbiology and Biotechnology, vol 99, p.10457–10466. 9 set 2015.

Tawfik, A.; El-Gohary F.; Temmink, H. Treatment of domestic wastewater in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor followed by moving bed biofilm reactor. Bioprocess Biosystems Engineering, vol 33, p. 267–276. 2010.

Téllez, P.E.P.; Salles, J.F. Construction of Effective Minimal Active Microbial Consortia for Lignocellulose Degradation. *Microbial Ecology*, 76:419–429 .1 Fev 2018.

United Nations. Energy. Department of Economic and Social Affairs. Sustainable Development. Disponível em: < <https://sdgs.un.org/topics/energy>>. Acesso em 24 de Out 2021.

Vendruscolo, E.C.G; Mesa, Dany; Rissi,D.V.; Meyer, B.H.; Oliveira, Fábio. Microbial communities network analysis of anaerobic reactors fed with bovine and swine slurry. *Science of the Total Environment.*, vol 742. 10 nov 2020.

Vermeiren, Hans; Willems, Anne; Schoofsi, Geert; Moti, R.D.;Keijersi, Veerle; Hali , Weill ;Vanderleyden, Andjos.The Rice Inoculant Strain *Alcaligenes faecalis* A 15is a Nitrogen-fixing *Pseudomonas stutzeri*. *Systematica and Applied Microbiology*,vol 22,215-224. 22 Jan 1999.

Wainaina, Steven; Lukitawesa; Awasthi ,M.K.; Taherzadeh, M.J.. Bioengineering of anaerobic digestion for volatile fatty acids, hydrogen or methane production: A critical review. *Bioengineered*, vol 10, issue 1,p. 437-458. 2020.

Wang, Haipeng ; Lim, Teng Teeh ; Duong, ; Zhang, Wei; Xu, Congfeng; Yan, Lei ; Mei, Zili; Wang Weidong .Long-Term Mesophilic Anaerobic Co-Digestion of Swine Manure with Corn Stover and Microbial Community Analysis. *Microorganisms*. 2020.

Wang, Ke; Chu, Chu; Li, Xiangkun; Wang, Wei; Ren, Nanqi .Succession of bacterial community function in cow manure composing. Elsevier, *Bioresource Technology*. 11 Jun 2018.

Wang, Shaojie ; Tang, Hongzhi ; Peng ,Fei ; Yu, Xijia; Su,Haijia; Xu, Ping ;Tan,Tianwei. Metabolite-based mutualism enhances hydrogen production in a two-species microbial consortium Sustainable hydrogen. *Communication Biology*, 2:82.28 Fev 2019.

Wang,H.Z.; Li, Jie ; Yi, Yue, Nobu, M.K.; Narihiro, Takashi;Tang, Y.Q. Response to inhibitory conditions of acetate-degrading methanogenic microbial community. Elsevier, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol xxx, no. xxxx, xxxx xxxx.2019.

Wang,Jing; Tavakoli, Javad; Tang,Youhong. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review . Carbohydrate Polymers, vol. 219, p. 63-76 19.1 set 2019.

X. X. Liu;Xin, Hu; Cao, Yue; Pang, W.J.; Huang, J.Y.; Guo , Peng; Huang, Lei. Biodegradation of Phenanthrene and Heavy Metal Removal by Acid-Tolerant *Burkholderia fungorum* FM-2. Frontier in Microbiology. Vol 10, 408 .14 de Mar 2019.

Xiao,Zhixing; Awata,Takanori; Zhang,Dongdong; Katayama ,Arata . Denitrification by *Pseudomonas stutzeri* coupled with CO₂ reduction by *Sporomusa ovata* with hydrogen as an electron donor assisted by solid-phase humin. Journal of Bioscience and Bioengineering, vol xx, n° xx, 1-7.2016.

Yang, Guang; Hu ,Yuming; Wang ,Jianlong. Biohydrogen production from co-fermentation of fallen leaves and sewage sludge. Bioresource Technology 285,121342. 2019.

Yang, Haibing; Zhang, Ximing; Luo, Hao; Liu, Baoyuan;. Shiga,T.M.; Li, Xu;, Kim, J.I.; Rubinelli, Peter; Overton,J.C.; Subramanyam, Varun; Cooper,B.R.; Mo,Huaping; Abu-Omar, M.M.; Chapple, Clint; Donohoe,B.S.; Makowski, Lee; Mosier,N.S.; McCann,M.C.; Carpita1, N.C.; Meilan,Richard. Overcoming cellulose recalcitrance in woody biomass for the lignin-first biorefinery. Biotechnology for Biofuels , 12:171. 29 Jun 2019.

Zarrin Basharat 1, Azra Yasmin1, Tongtong He2 & Yigang Tong 2.Genome sequencing and analysis of *Alcaligenes faecalis* subsp. *phenolicus* MB207.Scientific reports 8:3616. 2018.

Zhang, H.H.;Wang,Y.; Zhao,C.; Wang,J.e Zhang,X.L. Biodegradation of ochratoxin A by *Alcaligenes faecalis* isolated from soil.The Society for Applied Microbiology.Journal of Applied Microbiology.123,661-668.6 Jul 2017.

Zhou, Miaomiao; Yan, Binghua ; Wong,J.W.C.; Zhang, Yang. Enhanced volatile fatty acids production from anaerobic fermentation of food waste: A mini-review focusing on acidogenic metabolic pathways . Bioresource Technology vol 248,parte A, p. 68-78.Jan 2018.

Zhu, Hui; Fu,Bo; Lu, Shuailing ; Liu, Hongbo; Liu, He. *Clostridium bovifaecis* sp. nov., a novel acetogenic bacterium isolated from cow manure. Microbiology Society. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, vol 68 issue 9. 30 Jul 2018.

Ziganshin,A.M.; Ziganshina,E.E.; Kleinsteuber, Sabine; Nikolausz, Marcell.
Comparative Analysis of Methanogenic Communities in Different Laboratory-Scale Anaerobic Digesters. Hindawi Publishing Corporation, Archaea, vol 2016. 15 Dez 2016.

APÊNDICE

AMOSTRAS INICIAIS DO ENSAIO METANOGENICO

Gênero	inoc	inoc	
	UASB + FM	UASB + R	inoc UASB
<i>Alcaligenes</i>	0	0	0
<i>Aminobacterium</i>	1,812764	0	0
<i>Anaerobaculum</i>	13,98063	0	0
<i>Asaccharospora</i>	2,830891	0	0
<i>Bacillus</i>	0	0	0
<i>Bosea</i>	2,036255	2,393075	1,809955
<i>Clostridium</i>	22,00149	19,06823	37,86982
<i>Cryptanaerobacter</i>	0	0	0
<i>Ensifer</i>	0	2,342159	1,485091
<i>Gemmobacter</i>	0	1,858452	1,543102
<i>Leucobacter</i>	0	1,323829	1,090614
<i>Leuconostoc</i>	0	1,247454	1,925977
<i>Methanobacterium</i>	16,78669	18,02444	25,97749
<i>Methanoculleus</i>	0	11,0998	0
<i>Mycobacterium</i>	0	1,502037	2,19283
<i>Oscillatoria</i>	0	0	1,125421
<i>Paracoccus</i>	2,036255	2,113035	1,334262
<i>Peptoclostridium</i>	7,896697	0	0
<i>Petrimonas</i>	0	0	0
<i>Pleomorphomonas</i>	1,887261	4,531568	2,680125
<i>Pseudoclavibacter</i>	0	2,673116	0
<i>Pseudomonas</i>	5,264465	0	0
<i>Rhodoblastus</i>	1,167122	0	0
<i>Ruminofilibacter</i>	0	1,476578	0
<i>Rummeliibacillus</i>	0	1,476578	0
<i>Sarcina</i>	1,961758	2,113035	1,728739

<i>Shinella</i>	1,763099	5,193483	3,399466
<i>Soehngenia</i>	4,494661	0	1,543102
<i>Succiniclasticum</i>	0	1,629328	0
<i>Tepidanaerobacter</i>	1,390613	1,247454	0
<i>Treponema</i>	1,117457	0	0
<i>Turicibacter</i>	0	1,043788	1,032602
<i>Weissella</i>	0	1,960285	0
Outros	15,5699	18,68635	13,37742

Figura 15: *Heatmap* comparando as abundâncias relativas (maior que 1%) dos gêneros contidos nas amostras iniciais dos ensaios metanogênicos.

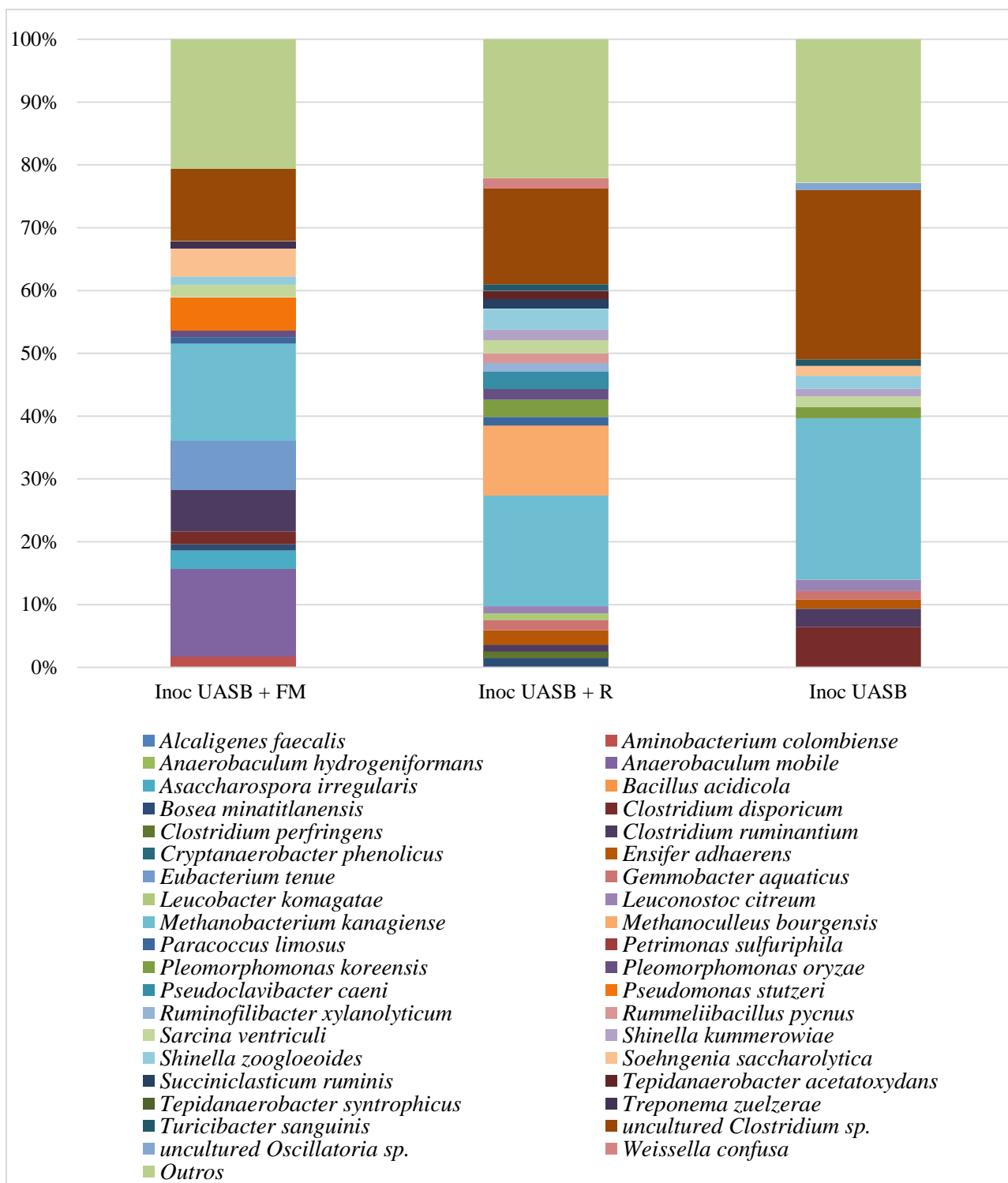


Figura 16: Gráfico comparativo da abundância percentual (maior que 1%) das espécies presentes nas amostras dos inóculos dos ensaios metanogênicos.

AMOSTRAS FINAIS DO ENSAIO METANOGENICO

Gênero	meth		
	meth UASB + FM	UASB + R	meth UASB
<i>Alcaligenes</i>	28,12647475	31,84914	45,59165
<i>Aminobacterium</i>	0	0	0
<i>Anaerobaculum</i>	16,51722511	1,466737	3,132251
<i>Asaccharospora</i>	0	0	0
<i>Bacillus</i>	8,824917414	0	0
<i>Bosea</i>	0	0	0
<i>Clostridium</i>	4,105710241	0	6,49652
<i>Cryptanaerobacter</i>	0	1,021477	0
<i>Ensifer</i>	0	0	0
<i>Gemmobacter</i>	0	0	0
<i>Leucobacter</i>	0	0	0
<i>Leuconostoc</i>	0	0	0
<i>Methanobacterium</i>	1,08541765	0	3,132251
<i>Methanoculleus</i>	0	0	0
<i>Mycobacterium</i>	0	0	0
<i>Oscillatoria</i>	0	0	0
<i>Paracoccus</i>	0	0	0
<i>Peptoclostridium</i>	0	0	0
<i>Petrimonas</i>	1,038225578	0	1,160093
<i>Pleomorphomonas</i>	0	0	0
<i>Pseudoclavibacter</i>	0	0	0
<i>Pseudomonas</i>	31,80745635	0	0
<i>Rhodoblastus</i>	0	0	0
<i>Ruminofilibacter</i>	0	58,72184	29,35035
<i>Rummeliibacillus</i>	0	0	0
<i>Sarcina</i>	0	0	0
<i>Shinella</i>	0	0	0
<i>Soehngenia</i>	2,689948089	0	0

<i>Succiniclasticum</i>	0	0	0
<i>Tepidanaerobacter</i>	1,415762152	0	1,276102
<i>Treponema</i>	0	0	0
<i>Turcibacter</i>	0	0	0
<i>Weissella</i>	0	0	0
Outros	4,388862671	6,940807	9,860789

Figura 17: *Heatmap* comparando as abundâncias relativas dos gêneros detectados nas amostras finais dos ensaios metanogênicos. *Outros: abundância menor que 1%.

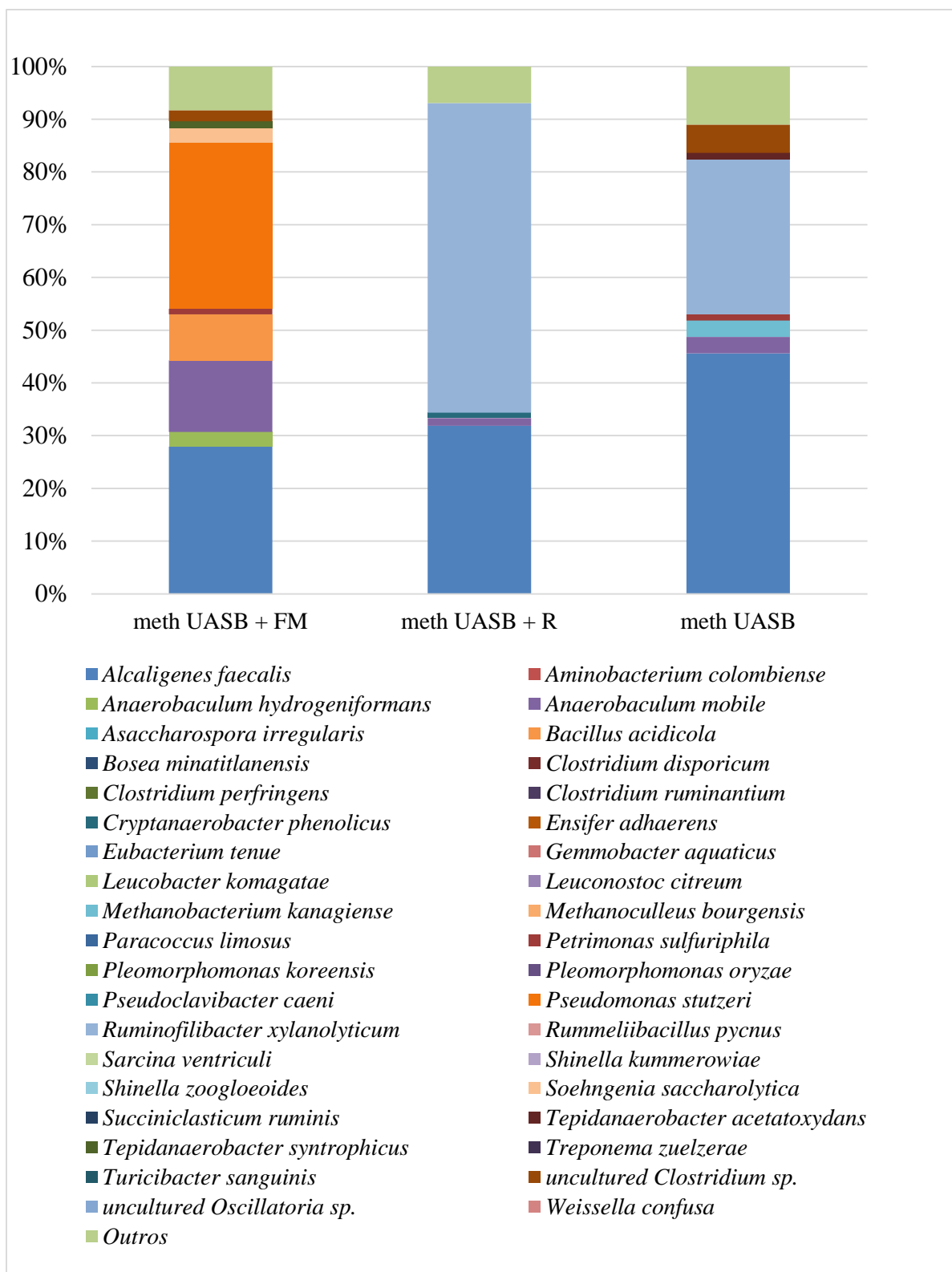


Figura 18: Abundância relativa percentual (maior que 1%) das espécies identificadas nas amostras finais dos ensaios metanogênicos.

Amostras do Ensaio de Hidrogênio		
Nome da amostra	Inoc UASB + FM	Inoc H2 UASB + FM
<i>Aminobacterium</i>	1,812763844	0
<i>Anaerobaculum</i>	13,98063074	0
<i>Asaccharospora</i>	2,830891482	0
<i>Bosea</i>	2,036255277	0
<i>Brevundimonas</i>	0	1,410842587
<i>Burkholderia</i>	0	76,21162639
<i>Clostridium</i>	22,00148994	1,110385369
<i>Methanobacterium</i>	16,78668984	0
<i>Paracoccus</i>	2,036255277	0
<i>Peptoclostridium</i>	7,896697293	0
<i>Pleomorphomonas</i>	1,887260988	0
<i>Pseudomonas</i>	5,264464862	0
<i>Rhodoblastus</i>	1,167121927	0
<i>Ruminofilibacter</i>	0	1,214892227
<i>Rummeliibacillus</i>	0	7,119529719
<i>Sarcina</i>	1,961758133	0
<i>Shinella</i>	1,763099081	0
<i>Soehngenia</i>	4,494661038	0
<i>Sphingobium</i>	0	5,969954278
<i>Sphingomonas</i>	0	3,422599608
<i>Tepidanaerobacter</i>	1,39061336	0
<i>Treponema</i>	1,117457164	0
Outros*	15,56990315	3,540169824

Figura 19: Heatmap comparando as abundâncias relativas dos gêneros detectados nos inóculos enriquecidos com estrume bovino sem (inoc UASB+FM) e com tratamento térmico para produção de hidrogênio (inoc H2 UAS+FM). *Outros: abundância menor que 1%.

Tabela 3: Presença ou Ausência das atividades dos Gêneros encontrados nos inóculos sem enriquecimento (inoc UASB), enriquecidos com esterco fresco bovino sem tratamento térmico (inoc UASB+FM), com rúmen bovino (inoc UASB+R) e das respectivas amostras retiradas no final dos ensaio metanogênicos (meth UASB, meth UASB+R, meth UASB+FM) (Kanehisa *et al.*, 2021).

Gênero	Hidrolítica	Acidogênica	Acetogênica	Metanogênica	Metanogênica
				Acetoclástica	Hidrogenotrófica
<i>Alcaligenes</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Aminobacterium</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Anaerobaculum</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Asaccharospora</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Bacillus</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Bosea</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Clostridium</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Cryptanaerobacter</i>	sim	não	não	não	não
<i>Ensifer</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Gemmobacter</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Leucobacter</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Leuconostoc</i>	sim	não	não	não	não
<i>Methanobacterium</i>	sim	não	não	sim	sim
<i>Methanoculleus</i>	sim	sim	não	não	sim
<i>Mycobacterium</i>	sim	não	sim	não	não
<i>Oscillatoria</i>	não	sim	não	não	não
<i>Paracoccus</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Peptoclostridium</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Petrimonas</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Pleomorphomonas</i>	sim	não	não	não	não
<i>Pseudoclavibacter</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Pseudomonas</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Rhodoblastus</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Ruminofilibacter</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Rummeliibacillus</i>	sim	sim	sim	não	não

<i>Sarcina</i>	sim	sim	sim	não	Não
<i>Shinella</i>	sim	sim	sim	não	Não
<i>Soehngenia</i>	sim	sim	sim	não	Não
<i>Succiniclasticum</i>	não	não	não	não	Não
<i>Tepidanaerobacter</i>	sim	não	não	não	Não
<i>Treponema</i>	sim	não	não	não	Não
<i>Turicibacter</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Weissella</i>	sim	não	não	não	não

Tabela 4: Presença ou ausência das atividades dos gêneros encontrados nos inóculos enriquecidos com esterco fresco bovino sem tratamento térmico (inoc UASB+FM) e com tratamento térmico para redução de gêneros consumidores de hidrogênio (inoc H2 UASB+FM) (Kanehisa *et al.*, 2021).

Gênero	Hidrolítica	Acidogênica	Acetogênica	Metanogênica	Metanogênica
				Acetoclásticas	Hidrogenotrófica
<i>Aminobacterium</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Anaerobaculum</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Asaccharospora</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Bosea</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Brevundimonas</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Burkholderia</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Clostridium</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Methanobacterium</i>	sim	não	não	sim	sim
<i>Paracoccus</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Peptoclostridium</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Pleomorphomonas</i>	sim	não	não	não	não
<i>Pseudomonas</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Rhodoblastus</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Ruminofilibacter</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Rummeliibacillus</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Sarcina</i>	sim	sim	sim	não	não

<i>Shinella</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Soehngenia</i>	sim	sim	sim	não	não
<i>Sphingobium</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Sphingomonas</i>	sim	sim	não	não	não
<i>Tepidanaerobacter</i>	sim	não	não	não	não
<i>Treponema</i>	sim	não	não	não	não

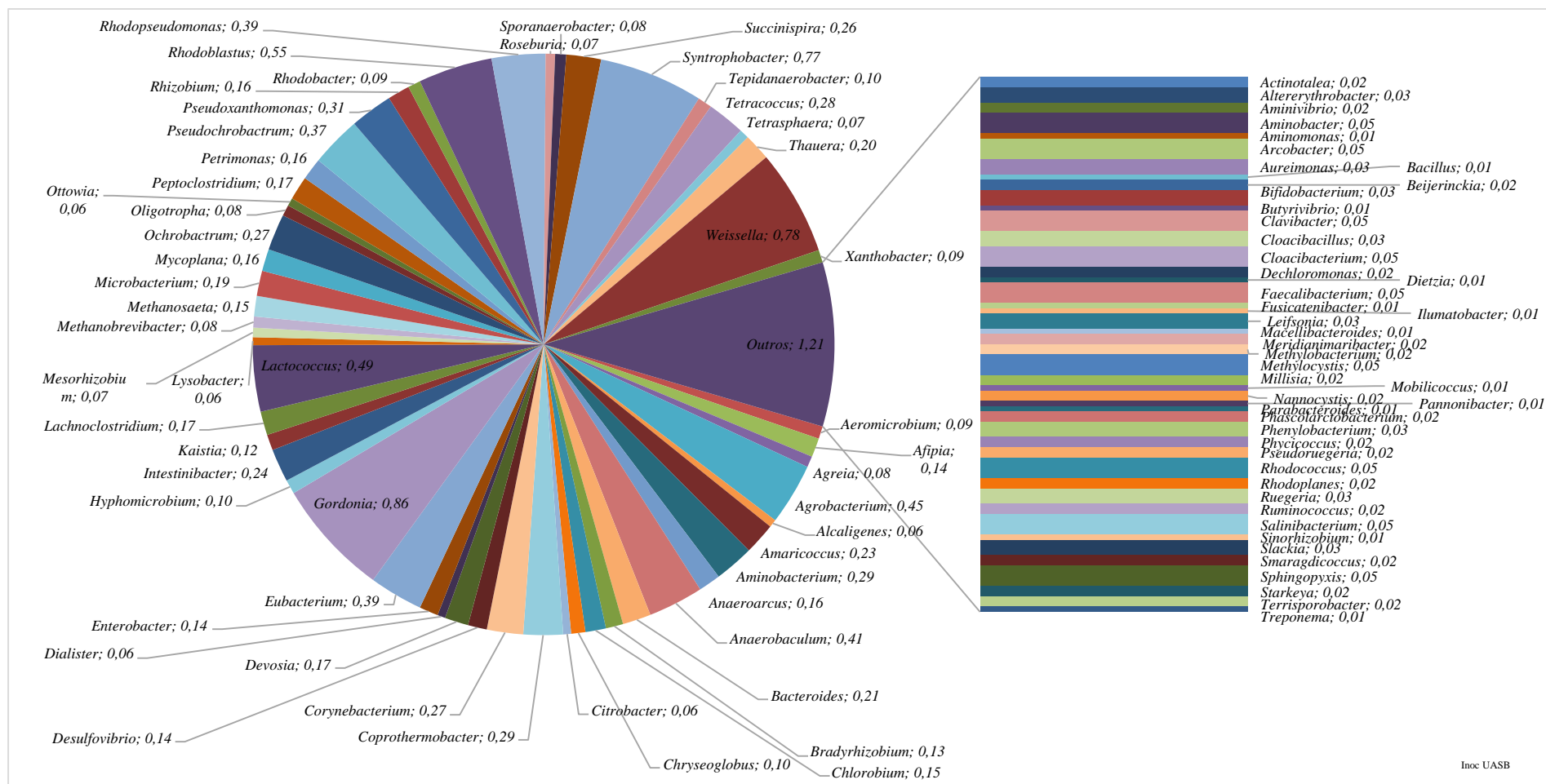


Figura 20: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra inoc UASB. A barra representa gêneros com abundância relativa percentual a abaixo de 0,05%.

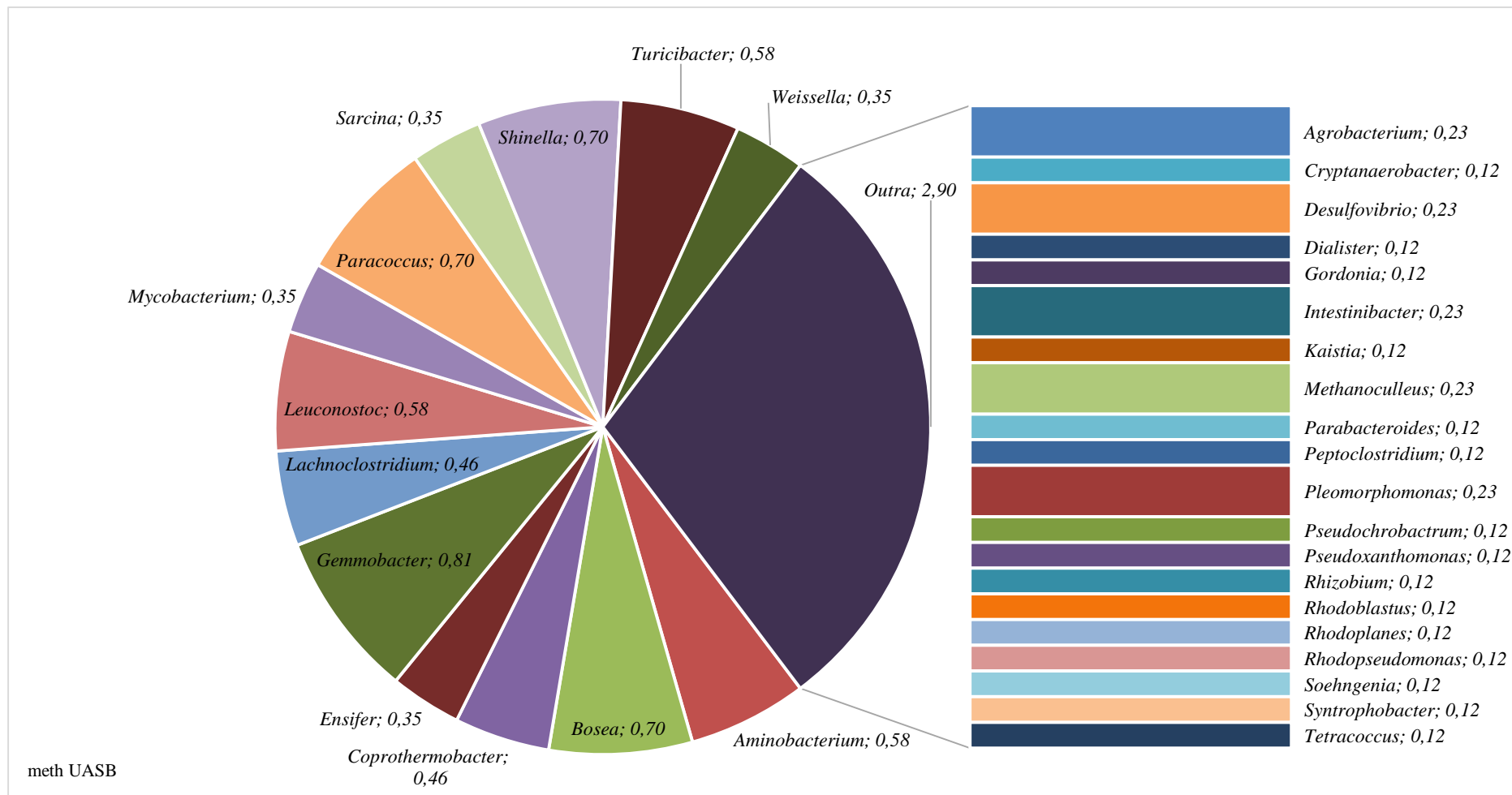


Figura 21: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra meth UASB. A barra representa gêneros com abundância relativa percentual a abaixo de 0,3%.

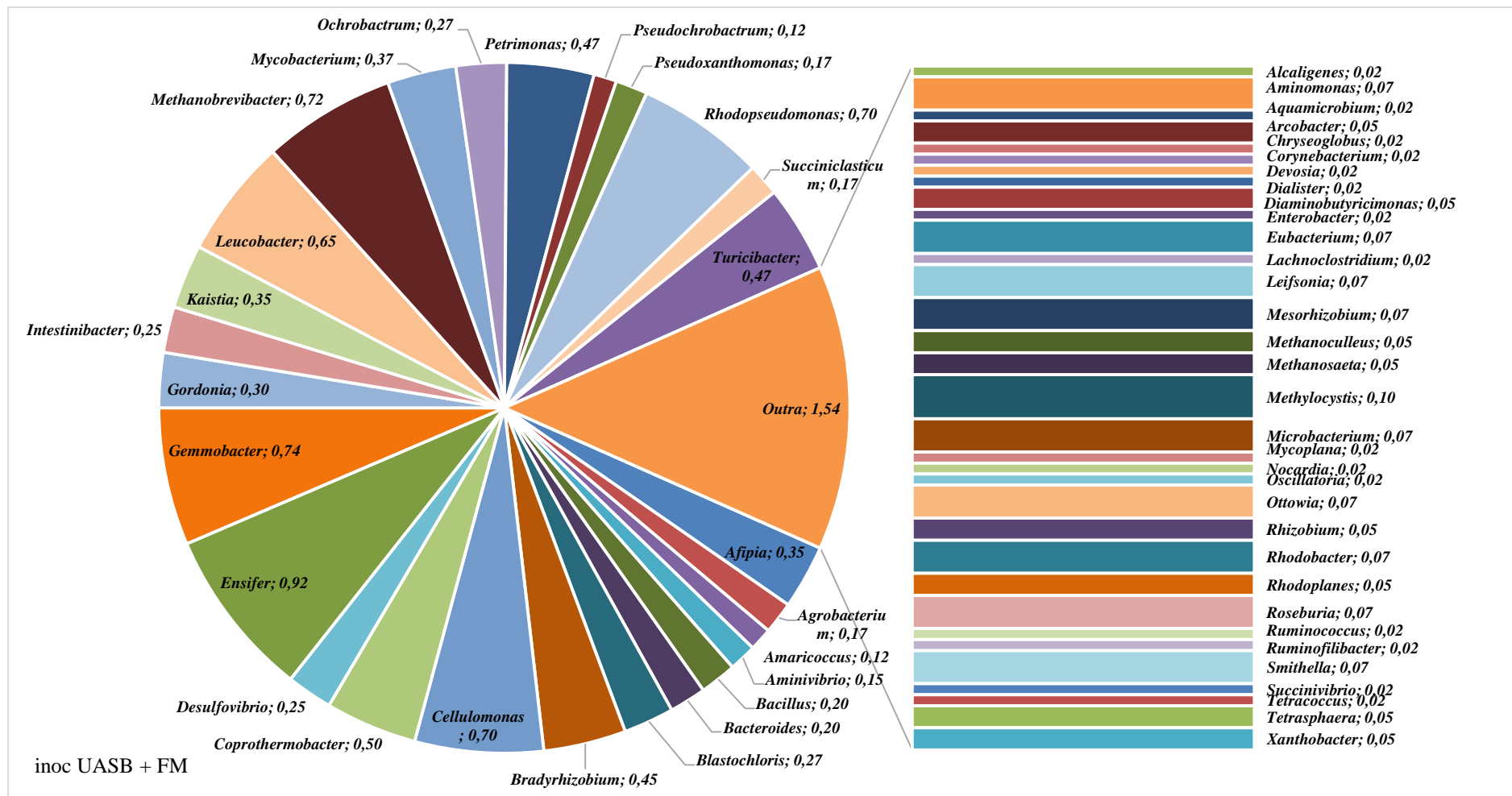


Figura 22: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra inoc UASB+FM. A barra representa gêneros com abundância relativa percentual a abaixo de 0,1%.

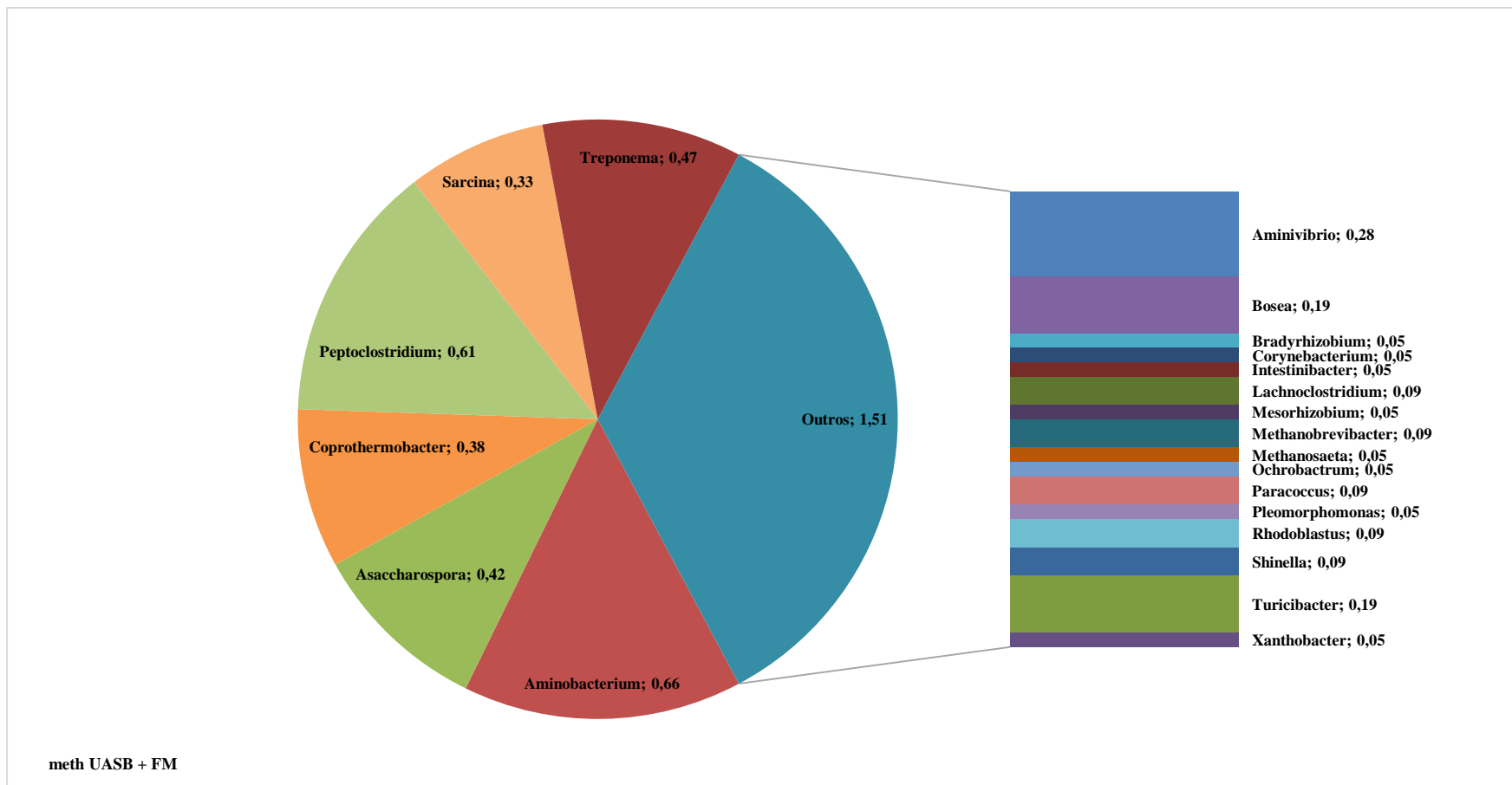


Figura 23: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra meth UASB+FM. Barra representa gêneros com abundância relativa percentual a abaixo de 0,3%.

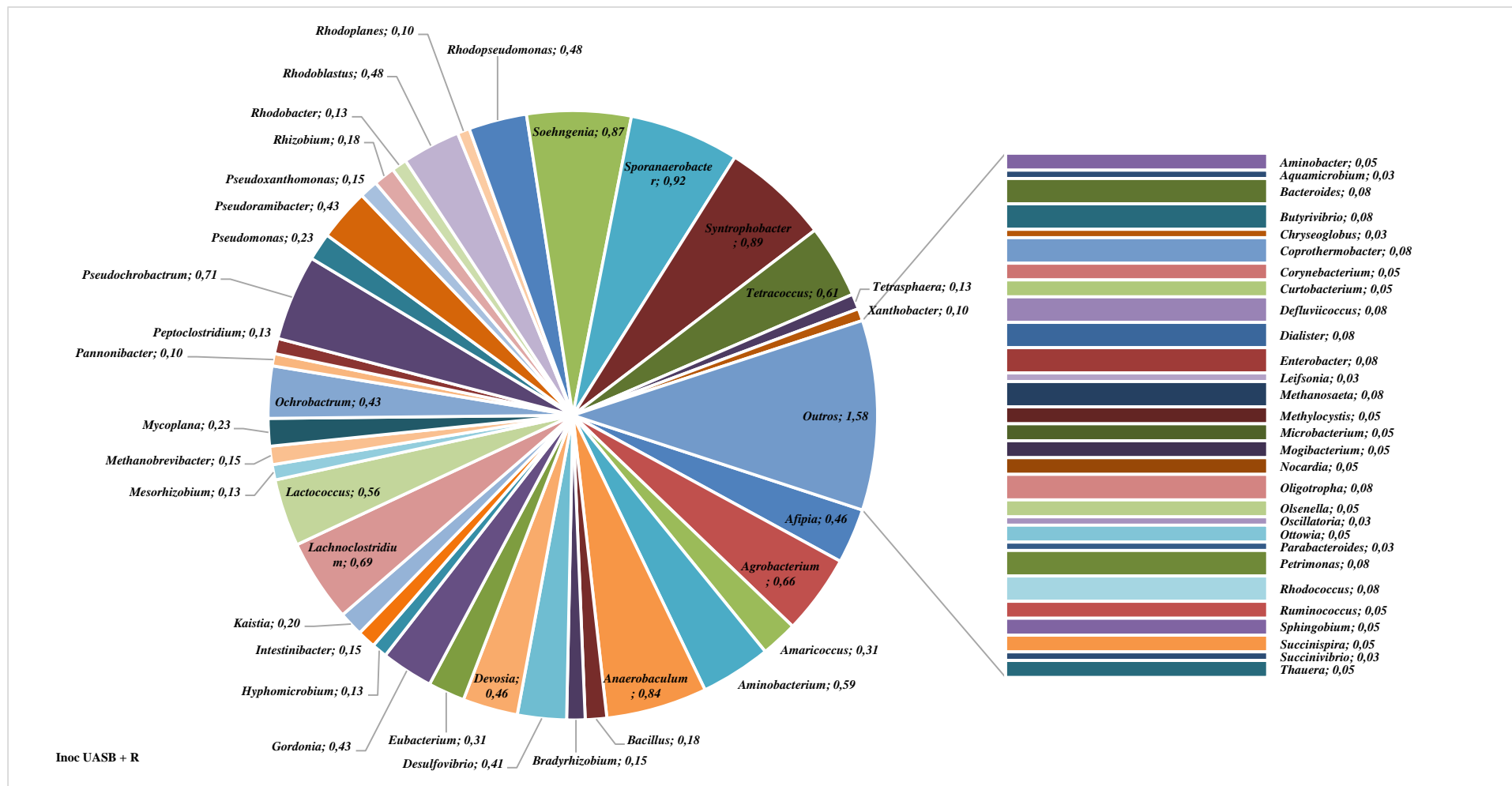


Figura 24: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra inoc UASB+R. A barra representa gêneros com abundância relativa percentual a abaixo de 0,1%.

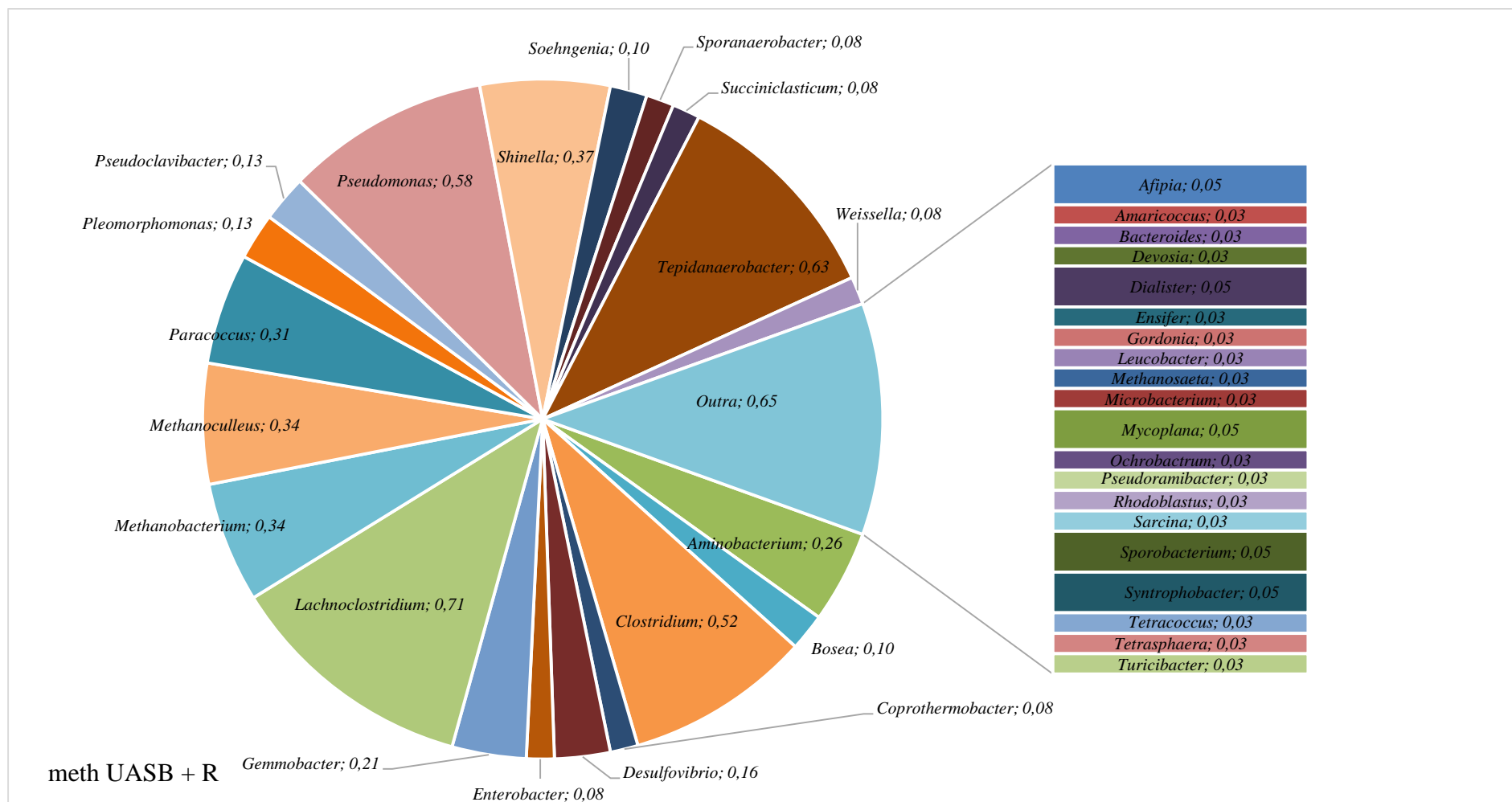


Figura 25: Gêneros com abundância percentual abaixo de 1% identificados na amostra meth UASB+R. A barra representa gêneros com abundância relativa percentual a abaixo de 0,07%.

Nome da amostra	Inoc UASB + FM	meth UASB + FM	Inoc UASB + R	meth UASB + R	Inoc UASB	meth UASB
<i>Acidaminococcus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Actinotalea</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Aeromicrobium</i>	0	0	0	0	0,09282	0
<i>Afipia</i>	0,34765	0	0,45824847	0,05238	0,13923	0
<i>Agreia</i>	0	0	0	0	0,08122	0
<i>Agrobacterium</i>	0,17383	0	0,66191446	0	0,45249	0,232
<i>Alcaligenes</i>	0,02483	28,1265	0	31,8491	0,05801	45,59
<i>Allisonella</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Altererythrobacter</i>	0	0	0	0	0,03481	0
<i>Amaricoccus</i>	0,12416	0	0,30549898	0,02619	0,23205	0
<i>Aminivibrio</i>	0,14899	0,28315	0	0	0,0232	0
<i>Aminobacter</i>	0	0	0,0509165	0	0,04641	0
<i>Aminobacterium</i>	1,81276	0,66069	0,58553971	0,26192	0,29006	0,58
<i>Aminomonas</i>	0,0745	0	0	0	0,0116	0
<i>Anaeroarcus</i>	0	0	0	0	0,16243	0
<i>Anaerobaculum</i>	13,9806	16,5172	0,8401222	1,46674	0,40608	3,132
<i>Aquamicrobium</i>	0,02483	0	0,02545825	0	0	0
<i>Arcobacter</i>	0,04966	0	0	0	0,04641	0
<i>Asaccharospora</i>	2,83089	0,42473	0	0	0	0
<i>Aureimonas</i>	0	0	0	0	0,03481	0
<i>Bacillus</i>	0,19866	8,82492	0,17820774	0	0,0116	0
<i>Bacteroides</i>	0,19866	0	0,07637475	0,02619	0,20884	0
<i>Beijerinckia</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Bifidobacterium</i>	0	0	0	0	0,03481	0
<i>Blastochloris</i>	0,27316	0	0	0	0	0

<i>Bosea</i>	2,03626	0,18877	2,39307536	0,10477	1,80995	0,696
<i>Bradyrhizobium</i>	0,44698	0,04719	0,15274949	0	0,12763	0
<i>Brevundimonas</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Burkholderia</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Butyrivibrio</i>	0	0	0,07637475	0	0,0116	0
<i>Caulobacter</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Cellulomonas</i>	0,69531	0	0	0	0	0
<i>Chlorobium</i>	0	0	0	0	0,15083	0
<i>Chryseoglobus</i>	0,02483	0	0,02545825	0	0,10442	0
<i>Citrobacter</i>	0	0	0	0	0,05801	0
<i>Clavibacter</i>	0	0	0	0	0,04641	0
<i>Cloacibacillus</i>	0	0	0	0	0,03481	0
<i>Cloacibacterium</i>	0	0	0	0	0,04641	0
<i>Clostridium</i>	22,0015	4,10571	19,0682281	0,52383	37,8698	6,497
<i>Coprothermobacter</i>	0,49665	0,37754	0,07637475	0,07858	0,29006	0,464
<i>Corynebacterium</i>	0,02483	0,04719	0,0509165	0	0,26685	0
<i>Cryptanaerobacter</i>	0	0	0	1,02148	0	0,116
<i>Cupriavidus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Curtobacterium</i>	0	0	0,0509165	0	0	0
<i>Dechloromonas</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Defluviicoccus</i>	0	0	0,07637475	0	0	0
<i>Desulfovibrio</i>	0,24832	0	0,40733198	0,15715	0,13923	0,232
<i>Devosia</i>	0,02483	0	0,45824847	0,02619	0,17403	0
<i>Dialister</i>	0,02483	0	0,07637475	0,05238	0,05801	0,116
<i>Diaminobutyricimonas</i>	0,04966	0	0	0	0	0
<i>Dietzia</i>	0	0	0	0	0,0116	0
<i>Ensifer</i>	0,9188	0	2,34215886	0,02619	1,48509	0,348
<i>Enterobacter</i>	0,02483	0	0,07637475	0,07858	0,13923	0
<i>Eubacterium</i>	0,0745	0	0,30549898	0	0,39448	0
<i>Faecalibacterium</i>	0	0	0	0	0,04641	0

<i>Fusicatenibacter</i>	0	0	0	0	0,0116	0
<i>Gemmobacter</i>	0,74497	0	1,85845214	0,20953	1,5431	0,812
<i>Gordonia</i>	0,29799	0	0,43279022	0,02619	0,85857	0,116
<i>Herbaspirillum</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Herbiconiux</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Hyphomicrobium</i>	0	0	0,12729124	0	0,10442	0
<i>Ilumatobacter</i>	0	0	0	0	0,0116	0
<i>Intestinibacter</i>	0,24832	0,04719	0,15274949	0	0,24365	0,232
<i>Janibacter</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Kaistia</i>	0,34765	0	0,20366599	0	0,11602	0,116
<i>Lachnoclostridium</i>	0,02483	0,09438	0,68737271	0,70718	0,17403	0,464
<i>Lactococcus</i>	0	0	0,56008147	0	0,4873	0
<i>Leifsonia</i>	0,0745	0	0,02545825	0	0,03481	0
<i>Leucobacter</i>	0,64564	0	1,32382892	0,02619	1,09061	0
<i>Leuconostoc</i>	0	0	1,24745418	0	1,92598	0,58
<i>Lysobacter</i>	0	0	0	0	0,05801	0
<i>Macellibacteroides</i>	0	0	0	0	0,0116	0
<i>Mahella</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Meridianimaribacter</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Mesorhizobium</i>	0,0745	0,04719	0,12729124	0	0,06961	0
<i>Methanobacterium</i>	16,7867	1,08542	18,0244399	0,34049	25,9775	3,132
<i>Methanobrevibacter</i>	0,72014	0,09438	0,15274949	0	0,08122	0
<i>Methanoculleus</i>	0,04966	0	11,0997963	0,34049	0	0,232
<i>Methanosaeta</i>	0,04966	0,04719	0,07637475	0,02619	0,15083	0
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Methylocystis</i>	0,09933	0	0,0509165	0	0,04641	0
<i>Microbacterium</i>	0,0745	0	0,0509165	0,02619	0,18564	0
<i>Millisia</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Mobilicoccus</i>	0	0	0	0	0,0116	0
<i>Mogibacterium</i>	0	0	0,0509165	0	0	0

<i>Mycobacterium</i>	0,37249	0	1,50203666	0	2,19283	0,348
<i>Mycoplana</i>	0,02483	0	0,22912424	0,05238	0,16243	0
<i>Nannocystis</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Nocardia</i>	0,02483	0	0,0509165	0	0	0
<i>Ochrobactrum</i>	0,27316	0,04719	0,43279022	0,02619	0,26685	0
<i>Oligotropha</i>	0	0	0,07637475	0	0,08122	0
<i>Olsenella</i>	0	0	0,0509165	0	0	0
<i>Oscillatoria</i>	0,02483	0	0,02545825	0	1,12542	0
<i>Ottowia</i>	0,0745	0	0,0509165	0	0,05801	0
<i>Pannonibacter</i>	0	0	0,10183299	0	0,0116	0
<i>Parabacteroides</i>	0	0	0,02545825	0	0,0116	0,116
<i>Paracoccus</i>	2,03626	0,09438	2,11303462	0,3143	1,33426	0,696
<i>Peptoclostridium</i>	7,8967	0,6135	0,12729124	0	0,17403	0,116
<i>Petrimonas</i>	0,47182	1,03823	0,07637475	0,99529	0,16243	1,16
<i>Phascolarctobacterium</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Phenylobacterium</i>	0	0	0	0	0,03481	0
<i>Phycococcus</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Pleomorphomonas</i>	1,88726	0,04719	4,53156823	0,13096	2,68013	0,232
<i>Pseudochrobactrum</i>	0,12416	0	0,71283096	0	0,37127	0,116
<i>Pseudoclavibacter</i>	0	0	2,67311609	0,13096	0	0
<i>Pseudomonas</i>	5,26446	31,8075	0,22912424	0,57622	0	0
<i>Pseudoramibacter</i>	0	0	0,43279022	0,02619	0	0
<i>Pseudoruegeria</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,17383	0	0,15274949	0	0,31326	0,116
<i>Rhizobium</i>	0,04966	0	0,17820774	0	0,16243	0,116
<i>Rhodobacter</i>	0,0745	0	0,12729124	0	0,09282	0
<i>Rhodoblastus</i>	1,16712	0,09438	0,48370672	0,02619	0,54531	0,116
<i>Rhodococcus</i>	0	0	0,07637475	0	0,04641	0
<i>Rhodoplanes</i>	0,04966	0	0,10183299	0	0,0232	0,116
<i>Rhodopseudomonas</i>	0,69531	0	0,48370672	0	0,39448	0,116

<i>Roseburia</i>	0,0745	0	0	0	0,06961	0
<i>Ruegeria</i>	0	0	0	0	0,03481	0
<i>Ruminococcus</i>	0,02483	0	0,0509165	0	0,0232	0
<i>Ruminofilibacter</i>	0,02483	0	1,47657841	58,7218	0	29,35
<i>Rummeliibacillus</i>	0	0	1,47657841	0	0	0
<i>Salinibacterium</i>	0	0	0	0	0,04641	0
<i>Sarcina</i>	1,96176	0,33034	2,11303462	0,02619	1,72874	0,348
<i>Shinella</i>	1,7631	0,09438	5,19348269	0,36668	3,39947	0,696
<i>Sinorhizobium</i>	0	0	0	0	0,0116	0
<i>Slackia</i>	0	0	0	0	0,03481	0
<i>Smaragdicoccus</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Smithella</i>	0,0745	0	0	0	0	0
<i>Soehngenia</i>	4,49466	2,68995	0,86558045	0,10477	1,5431	0,116
<i>Sphingobium</i>	0	0	0,0509165	0	0	0
<i>Sphingomonas</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Sphingopyxis</i>	0	0	0	0	0,04641	0
<i>Sporanaerobacter</i>	0	0	0,91649695	0,07858	0,08122	0
<i>Sporobacterium</i>	0	0	0	0,05238	0	0
<i>Starkeya</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Succiniclasticum</i>	0,17383	0	1,6293279	0,07858	0	0
<i>Succinispira</i>	0	0	0,0509165	0	0,25525	0
<i>Succinivibrio</i>	0,02483	0	0,02545825	0	0	0
<i>Syntrophobacter</i>	0	0	0,8910387	0,05238	0,76575	0,116
<i>Tepidanaerobacter</i>	1,39061	1,41576	1,24745418	0,6286	0,10442	1,276
<i>Terrisporobacter</i>	0	0	0	0	0,0232	0
<i>Tetracoccus</i>	0,02483	0	0,61099796	0,02619	0,27845	0,116
<i>Tetrasphaera</i>	0,04966	0	0,12729124	0,02619	0,06961	0
<i>Thauera</i>	0	0	0,0509165	0	0,19724	0
<i>Treponema</i>	1,11746	0,47192	0	0	0,0116	0
<i>Turicibacter</i>	0,47182	0,18877	1,04378819	0,02619	1,0326	0,58

<i>Weissella</i>	0	0	1,96028513	0,07858	0,77735	0,348
<i>Xanthobacter</i>	0,04966	0,04719	0,10183299	0	0,09282	0
<i>Xenophilus</i>	0	0	0	0	0	0

Figura 26: *Heatmap* apresentando as abundâncias relativas percentuais das amostras do ensaio metanogênico incluído o grupo “Outros”, que possuem abundância menor que 1%.

