



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Departamento de Ciências Biológicas



**METAGENÔMICA ALIADA À AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMPOSIÇÃO
MICROBIANA PARA PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DE BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA**

Igor Aparecido Santana das Chagas

Ouro Preto, MG
2019

Igor Aparecido Santana das Chagas

**METAGENÔMICA ALIADA À AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMPOSIÇÃO
MICROBIANA PARA PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DE BIOMASSA
LIGNOCELULÓSICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Ciências Biológicas, em cumprimento às exigências do Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto - Campus Morro do Cruzeiro.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvana de Queiroz Silva
Coorientadora: M.^a Camila de Paula Dias

Ouro Preto, MG
2019

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

C433m Chagas, Igor Aparecido Santana das .
Metagenômica aliada à avaliação do efeito da composição
microbiana para produção de metano a partir de biomassa
lignocelulósica. [manuscrito] / Igor Aparecido Santana das Chagas. -
2019.
30 f.: il.: color., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva.
Coorientadora: Ma. Camila de Paula Dias.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Graduação em Ciências
Biológicas .

1. Metano. 2. Lignina. 3. Celulose. 4. Digestão anaeróbia. 5. Biomassa
vegetal. I. Dias, Camila de Paula. II. Silva, Silvana de Queiroz. III.
Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU 577

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Monografia Intitulada:

**“METAGENÔMICA ALIADA À AVALIAÇÃO DO EFEITO DA COMPOSIÇÃO MICROBIANA
PARA PRODUÇÃO DE METANO A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA”**

Aos 16 dias do mês de dezembro de 2019, as 10:00 horas, na Sala de Seminários do Departamento de Ciências Biológicas do ICEB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Monografia do aluno Igor Aparecido Santana das Chagas. A defesa pública de monografia iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e declararam o candidato aprovado com a nota 10.

Membros da Banca Examinadora

Profa. Dra. Silvana de Queiroz Silva
Orientadora (Dep. Ciências Biológicas - UFOP)

Profa. Dra. Deyse Almeida dos Reis
Examinadora (PROAMB - UFOP)

Prof. Dr. Guilherme de Paula Costa
Examinador (Dep. Ciências Biológicas - UFOP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade maior de viver e absorver todo conhecimento adquirido até hoje. Passado esse momento, tenho fé de que poderei continuar essa trajetória na ciência, a fim de retribuir e cativar outras pessoas da mesma forma como fui seduzido no passado.

Agradeço aos meus tios (Zezé e Glória) por tudo que fizeram e fazem por mim, se cheguei até aqui foi graças a vocês! Obrigado por comprarem a ideia e acreditarem em mim! À minha mãe (Josefa) e ao meu irmão (Marcos) mesmo distantes me deram apoio em momentos especiais.

Um agradecimento especial vai para meu Tio, como sempre falo é meu pai, padrinho e avó e que mesmo nessa fase atual, com a saúde comprometida, sempre acreditou em mim e esteve junto em todas as etapas me incentivando! Te amo!

A Dr.^a Fernanda Badotti (CEFET-MG) por ter me feito olhar para a vida acadêmica com outros olhos! Às Dr.^{as} Gislaine Fongaro (UFSC) e Maria Célia (UFOP) pela oportunidade e aprendizado! Agradeço à Dr.^a Silvana (UFOP) pela orientação em nome de toda a equipe do LBTM pelas experiências compartilhadas e pela capacitação técnica ao longo do meu tempo nesse laboratório.

Aos amigos inesquecíveis de laboratório que levarei para a vida toda: Adriana Cotta, Ana Martins, Ivon Campos, Joane Miari, Nathália Vercelli, Regina Assenço e Túlio César! A você Nice ao qual sempre compartilhamos os momentos difíceis e mesmo assim continuamos seguindo! Aos meus amados vizinhos Nilza, Ronne e Mel pela confiança depositada em mim!

Aos queridos amigos do D&D Eduardo (Mestre), Bárbara (Visenya), Guilherme (Dominus), Fernanda (Quelenna), Gabriel (Táliesin), Vinícius (Araucefirin) e a mim (Lord Hammer) pelas grandiosas histórias que vencemos e que de certo modo nos transportam para um lugar exclusivo! Aos meus amigos de infância Pedro Siqueira e Vinicius César por estarmos sempre neste barco da vida!

As duplas dinâmicas Laís Ribeiro/Lucas Sol e Danielle Souto/Maicon Jonathan por sofrermos juntos nessa UFOP e partilharmos do sentimento, obrigado pelos conselhos e incentivos!

Aos meus amigos/irmãos Bruna Ribeiro, Erick Fernandes, Gabriela Cristina, Lucas Rezende e Mike dos Santos mesmo à distância sempre me apoiaram, agradeço pela paciência e, principalmente, pelas motivações constantes.

Aos mestres dessa casa que se dedicam ao trabalho árduo de ser professor em tempos obscuros para a ciência, educação e tecnologia, o meu muito obrigado por tudo! Em especial para os Drs. Aníbal Santiago, Fábio Augusto e Rodrigo Araújo e as Dr.^{as} Ana Letícia, Gabriela Froes e Maria Rita por todo o empenho, sinceridade e dedicação!

E, por fim, as amizades inesquecíveis que construí aqui em Ouro Preto! O meu muito obrigado e desejo que vocês sejam sempre felizes e na esperança da realização de todos os seus sonhos! Nunca esquecerei cada café “de manhã”, tarde e nos laboratórios, almoços, passeios, congressos, cada experiência trocada ficou marcado em meu coração!

Alejandra Rojas, mesmo que rápido o tempo em que tivemos contato, você é única e uma amiga de um coração enorme!

Camila Dias, minha coorientadora e grande amiga você é sensacional, obrigado por todos os momentos, e espero que possamos continuar trabalhando juntos!

Célia Machado, o pessoal na rua já nos confunde como mãe e filho e de fato és uma grande Mãe para todos nós!

Daniela Batista por ser uma das melhores técnicas e por me ouvir todas as manhãs no corredor do DEBIO, pela compaixão e sinceridade!

Deyse Reis, nossa amizade começou lá atrás e a cultivamos sempre de forma mútua, nos ajudando em todos os momentos, agradeço por cada aprendizado!

Raquel Sávio, pelos conselhos, amizade e carinho!

Meus amigos de graduação Isabella Lopes, Clóvis Ferreira e Sabrina Florêncio por me ouvir e chorar as pitangas, os desesperos por tudo e por sempre estarem juntos.

E, por fim você, Zé, acredito que não seria capaz de chegar até esse momento se não fosse pelo seu apoio, carinho, amizade e estímulo, obrigado pela parceria e compressão!

Ao conselho Nacional de Pesquisa – CNPQ e a UFOP/PROPP pelo apoio financeiro e CAPES pela bolsa.

À banca avaliadora, pelas sugestões valiosas para o desenvolvimento deste trabalho. E a todos que de alguma forma contribuíram e/ou torceram pela realização dessa monografia.

Aos demais, meus sinceros agradecimentos!

*A você, que é padrinho, avô, tio e sobretudo
meu grande Pai! Obrigado por tudo
Tio Zezé, te amo muito!*

O mundo não está em seus livros e mapas. Ele está lá fora!
Gandalf, o cinzento

Choramos ao nascer porque chegamos a este imenso cenário de dementes!
William Shakespeare

Até que tenhamos coragem de reconhecer crueldade pelo que ela é – seja a vítima um animal humano ou não humano – não podemos esperar que as coisas melhorem neste mundo... não podemos ter paz vivendo entre homens cujos corações se deleitam em matar criaturas vivas. Para cada ato que glorifica o prazer de matar, estamos atrasando o progresso da humanidade.
Rachel Carson

RESUMO

As fontes de energias fósseis mais utilizadas sempre foram a partir de recursos não renováveis. Atualmente, o uso de combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis tem aumentado o que favorece a redução do impacto ambiental. O Brasil produziu aproximadamente 625,9 milhões de toneladas de cana-de-açúcar pelo setor sucroalcooleiro na safra 2018/2019 e gerou uma elevada produção de resíduos agroindustriais. A utilização de resíduos, como o bagaço de cana-de-açúcar, para a obtenção de energia torna-se uma atrativa aplicação que agrega valor a esses resíduos. Um combustível que pode ser obtido a partir do bagaço de cana é o biogás, constituído principalmente por metano. Para a obtenção do biogás é necessário que ocorra o processo biológico anaeróbio em que uma complexa rede de diferentes microrganismos, indivíduos dos domínios Bactéria e Archaea, atuem conjuntamente com suas diferentes habilidades metabólicas a fim de converter os açúcares presentes no material lignocelulósico a metano. Considerando que a conversão depende de um consórcio microbiano eficiente e bem adaptado ao substrato, faz-se necessário avaliar diferentes tipos de inóculos como fonte de microrganismos. Neste trabalho foram realizados ensaios de digestão anaeróbia de bagaço de cana para produção de metano com três diferentes inóculos: lodo de reator anaeróbio tipo UASB; lodo de UASB acrescido rúmen e; lodo de UASB acrescido de estrume bovino. Os experimentos foram realizados durante 100 dias e durante esse período foi medido a quantidade de gás metano produzido. A microbiota dos inóculos, bem como, ao fim dos ensaios foram submetidas ao sequenciamento NGS. Ao nível de Família, o inóculo UASB acrescido ou não de estrume bovino promoveram um enriquecimento microbiano das famílias Thermotogae e Bacteroidetes. A adição de estrume ao lodo UASB promoveu uma rápida produção de metano, o que pode ter sido ocasionada pela presença inicial de microrganismos hidrolíticos e adaptados a materiais lignocelulósicos, provavelmente do filo Proteobacteria. O reator inoculado com UASB e estrume bovino foi o mais efetivo para a biometanização em maiores taxas e menos tempo, principalmente por não ter apresentado uma fase *lag*. Logo, conhecer a comunidade microbiana a nível de espécie se faz necessário para melhor entendimento das rotas metabólicas envolvidas no processo de produção de metano.

Palavras-chave: Metano, lignina, celulose, digestão anaeróbia, biomassa vegetal.

ABSTRACT

The most widely used sources of fossil energy have always been from non-renewable resources. Currently, the use of fuels produced from renewable sources has increased which favors the reduction of environmental impact. Brazil produced approximately 625.9 million tons of sugarcane by the sugar and alcohol sector in the 2018/2019 crop and generated a high production of agro-industrial waste. The use of waste, such as sugarcane bagasse, to obtain energy becomes an attractive application that adds value to this waste. One fuel that can be obtained from sugarcane bagasse is biogas, consisting mainly of methane. In order to obtain biogas, an anaerobic biological process must occur in which a complex network of different microorganisms, individuals from the Bacteria and Archaea domains, act together with their different metabolic abilities in order to convert the sugars present in the lignocellulosic material to methane. Considering that the conversion depends on an efficient and well adapted substrate microbial consortium, it is necessary to evaluate different types of inoculum as a source of microorganisms. In this work anaerobic digestion of sugarcane bagasse for methane production with three different inocula were performed: UASB anaerobic reactor sludge; UASB sludge plus rumen; UASB sludge plus cattle manure. The experiments were performed for 100 days and during this period the amount of methane gas produced was measured. The inoculum microbiota as well as, at the end of the tests were submitted to NGS sequencing. At the Family level, the UASB inoculum with or without cattle manure promoted a microbial enrichment of the Thermotogae and Bacteroidetes families. The addition of manure to the UASB sludge promoted a rapid methane production, which may have been caused by the initial presence of hydrolytic microorganisms adapted to lignocellulosic materials, probably from the phylum Proteobacteria. The reactor inoculated with UASB and cattle manure was the most effective for biomethanization at higher rates and less time, mainly because it did not have a lag phase. Therefore, knowing the microbial community at the species level is necessary to better understand the metabolic pathways involved in the methane production process.

Keywords: Methane, lignin, cellulose, anaerobic digestion, vegetable biomass.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas da digestão anaeróbia	5
Figura 2: Inóculos utilizados para a produção de biogás a partir do bagaço da cana-de-açúcar pela digestão anaeróbia	10
Figura 3: Gel de eletroforese após a purificação de DNA.....	14
Figura 4: Produção de metano ao longo do processo de digestão anaeróbia.....	16
Figura 5: Taxa de distribuição microbiana para filo em diferentes tratamentos antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização	20
Figura 6: Taxa de distribuição microbiana para família em diferentes tratamentos antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização.....	23
Figura 7: Taxa de distribuição microbiana para gênero em diferentes tratamentos antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização.....	25
Figura 8: Similaridade presente entre os tratamentos para filo antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização.....	29

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Inóculos utilizados	10
Quadro 2: Classificação dos grupos encontrados pela análise metagenômica	19
Quadro 3: Dominância das famílias identificadas em cada reator	22
Quadro 4: Protocolo de extração de DNA genômico.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos (em azul) ligados ao <i>barcode</i> (em preto) e adaptador (em vermelho) que foram usados.....	12
Tabela 2: Reagentes utilizados.....	13
Tabela 3: Programação do termociclador (Biocycler®).....	13
Tabela 4: Teor de sólidos totais no experimento e produção acumulada de metano para cada inóculo utilizado	16
Tabela 5: Presença/ausência dos filos microbianos nos diferentes reatores antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização	20
Tabela 6: Presença/ausência de famílias microbianas nos diferentes reatores antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(A)	-	Antes do ensaio
(D)	-	Depois do ensaio
1G	-	Etanol de primeira geração
2G	-	Etanol de segunda geração
AGV	-	Ácidos graxos voláteis de cadeia curta
CePTS	-	Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento
CG	-	Cromatógrafo de fase gasosa
CONAB	-	Companhia Nacional de Abastecimento
ETE	-	Estação de tratamento de esgoto
NGS	-	<i>Next Generation Sequencing</i>
NL	-	Normal Litro
PCR	-	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RPM	-	Rotação por minuto
SL-AD	-	Digestão Anaeróbia em Fase Líquida
SS-AD	-	Digestão Anaeróbia em Fase Sólida
SV	-	Sólidos voláteis
UASB	-	<i>Upflow Anaerobic Sludge Blanket Reactor</i> (Lodo de reator anaeróbio)
UASB-BR	-	Lodo de reator anaeróbio acrescido de rúmen bovino
UASB-FBM	-	Lodo de reator anaeróbio acrescido de estume bovino
UFMG	-	Universidade Federal de Minas Gerais
UFOP	-	Universidade Federal de Ouro Preto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	DIGESTÃO ANAERÓBIA EM FASE SÓLIDA (SS-AD).....	2
1.2	DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS.....	3
1.3	INÓCULO.....	6
1.4	A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA O ENTENDIMENTO DA ECOLOGIA MICROBIANA	7
2	JUSTIFICATIVA.....	8
3	OBJETIVOS	9
3.1	GERAL.....	9
3.2	ESPECÍFICO	9
4	MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1	PREPARAÇÃO DO INÓCULO.....	10
4.2	ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE METANO	11
4.3	COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	11
4.4	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	12
4.4.1	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	12
4.4.2	QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	12
4.4.3	AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE DNAr 16S	12
4.4.4	METAGENÔMICA PELO USO DA PLATAFORMA Ion Torrent®	14
4.5	ANÁLISE DOS DADOS.....	14
4.5.1	FÍSICAS E QUÍMICAS	14
4.5.2	BIOLÓGICOS.....	15
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	16
5.1	PRODUÇÃO DE METANO	16
5.2	ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	18
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31
	ANEXO A.....	38

1 INTRODUÇÃO

As fontes de energias fósseis mais utilizadas sempre foram o petróleo, o gás natural e o carvão mineral que são provenientes de recursos não renováveis. Atualmente, os combustíveis produzidos a partir de fontes renováveis têm ganhado espaço no mercado (PAIXÃO, 2009). Uma das vantagens dos combustíveis renováveis é reduzir o impacto ambiental, além de serem capazes de suportar a demanda decorrente do crescimento econômico (CORTEZ; MAGALHÃES; BRAUNBECK, 2010).

Uma forma de geração de energia renovável que despontou no Brasil em 1975 foi a produção de etanol de primeira geração (1G) a partir de incentivos do Governo Federal com a criação do programa Proálcool (HOFSETZ; SILVA, 2012; CORTEZ; MAGALHÃES; BRAUNBECK, 2010). Este biocombustível é produzido em larga escala no Brasil, a partir da sacarose extraída da cana-de-açúcar. Em outros países, o bioetanol é gerado pela fermentação de açúcares extraídos de outros tipos de biomassas, como o milho e a beterraba.

O Brasil produziu aproximadamente 625,9 milhões de toneladas de cana-de-açúcar no setor sucroalcooleiro na safra 2018/2019 segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2019). Deste total de cana-de-açúcar produzida, 31,35 milhões de toneladas foi destinada à produção de açúcar e outra parte à produção de etanol, gerando 33,58 bilhões de litros (CONAB, 2019).

Entretanto, a elevada produção de bioetanol e açúcar gera também um grande volume de bagaço e palha de cana, que segundo Rocha e colaboradores (2015), correspondem a aproximadamente 35% do volume total de cana-de-açúcar produzido. Esse resíduo gerado possui baixa densidade o que gera um grande volume e pouco valor agregado, por isso, muitas vezes o destino final é a queima para geração de vapor e eletricidade dentro das usinas sucroalcooleiras (HOFSETZ; SILVA, 2012). Porém, essa destinação para resíduos lignocelulósicos é considerada como perda do potencial energético.

A utilização de resíduos lignocelulósicos, por exemplo, o bagaço de cana, como matéria prima para a produção de biocombustíveis e bioprodutos de valor agregado é uma alternativa ambientalmente satisfatória (BAËTA et al., 2016), principalmente,

por ser uma matéria prima barata e abundante que são características relevantes para a produção de combustíveis renováveis.

As biomassas lignocelulósicas são ricas em carboidratos presentes na forma de celuloses e hemiceluloses. O material lignocelulósico é composto, aproximadamente, de 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). O composto mais abundante é a celulose composta principalmente por moléculas de glicose, estas longas cadeias de polissacarídeos cristalinas apresentam suas cadeias ligadas por pontes de hidrogênio que formam microfibrilas, estruturas insolúveis (OGEDA; PETRI, 2010; SOUZA-CORREIA et al., 2013). A hemicelulose é um polímero formado por diversos açúcares: glicose, galactose, manose, xilose e arabinose, enquanto a lignina é formada por compostos fenólicos (OGEDA; PETRI, 2010; SOUZA-CORREIA et al., 2013).

Os resíduos lignocelulósicos para serem convertidos, precisam receber um pré-tratamento, que pode ser biológico, físico ou químico, desta forma ocorrerá à separação da lignina, hemicelulose e celulose, favorecendo a ação das enzimas sobre o substrato e os açúcares livres (SOUZA-CORREIA et al., 2013). A hidrólise disponibiliza compostos de cadeia curta e polímeros solúveis, desta forma a celulose é convertida em glicose; a hemicelulose em pentoses, como xilose e arabinose, ou hexoses, como glicose (LAMONICA, 2004).

1.1 DIGESTÃO ANAERÓBIA EM FASE SÓLIDA (SS-AD)

Entre as possíveis configurações de digestão anaeróbia (AD) com finalidade a obtenção de biogás por meio de altas cargas de bagaço de cana-de-açúcar, ressalta a digestão anaeróbia em fase sólida (SS-AD), conhecida como fermentação seca, fermentação em estado sólido ou ainda por digestão seca (LIMA, 2018).

Seu principal aspecto que coloca em destaque a utilização dessa técnica é devido a bioconversão de cargas elevadas de substratos sólidos orgânicos em biogás (de 60 a 70% de metano) e a obtenção de um substrato enriquecido com nitrogênio (LI; PARK; ZHU, 2011). Devido aos interessantes produtos gerados nessa etapa, a SS-AD ganha destaque pelo baixo custo em escala laboratorial e experimental.

Quando comparado a outros métodos, como por exemplo, a digestão anaeróbia em fase líquida (SL-AD), a SS-AD apresenta vantagens, principalmente quando se pensa em aplicá-la em grandes escalas, para o mesmo carregamento de sólidos necessita de um menor volume do reator, baixo consumo de energia para operá-lo e facilidade no manuseio do produto final (LI; PARK; ZHU, 2011; BROWN; SHI; LI, 2012). Ademais, a SS-AD garante altas velocidades de produção e degradação de biogás e baixa geração de líquidos no processo. Diante dessas características, sua produção varia de 2 a 7 vezes mais que a convencional digestão anaeróbia em fase líquida (BROWN; SHI; LI, 2012; LIMA, 2018).

Ainda que as vantagens apresentadas são de fato interessantes, muitos dos processos utilizados precisam ser aprimorados para eventual comercialização da técnica. Contudo, o tempo de retenção devido ao transporte de massa é mais lento quando comparado com o SL-AD (LI; PARK; ZHU, 2011).

O principal aspecto que coloca o SS-AD com aplicação na biodegradação de resíduos lignocelulósicos é o uso direto do bagaço de cana-de-açúcar para geração de biogás. Em escala industrial, o reator pode ser alimentado com bagaço de cana residual advindo direto da produção de etanol (1G) e açúcar e, ainda, passar por etapas de pré-tratamento ou vir da produção de etanol (2G) (LIMA, 2018).

1.2 DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Conforme demonstrado na Figura 1, o processo de digestão anaeróbia é dividido em quatro etapas, sendo elas: I. hidrólise, II. acidogênese, III. acetogênese e IV. metanogênese. Estas etapas são realizadas por classes de microrganismos diferentes conforme cada etapa. De mesma forma, os mecanismos de inibição e indução são específicos para cada consórcio microbiano (AKSHAYA et al., 2016).

A hidrólise é fundamental para a redução do tamanho das partículas e sua solubilização, sendo a primeira etapa da degradação anaeróbica da matéria orgânica. O objetivo do processo de hidrólise é a quebra das longas cadeias orgânicas, reduzindo seu tamanho com a produção de monômeros solúveis. Durante a hidrólise, polissacarídeos e xilo-oligômeros, por exemplo, são reduzidos a açúcares, aminoácidos, ácidos graxos e álcoois. Este processo é resultado da atuação de enzimas como celulases, lipases e amilases, que são produzidas por

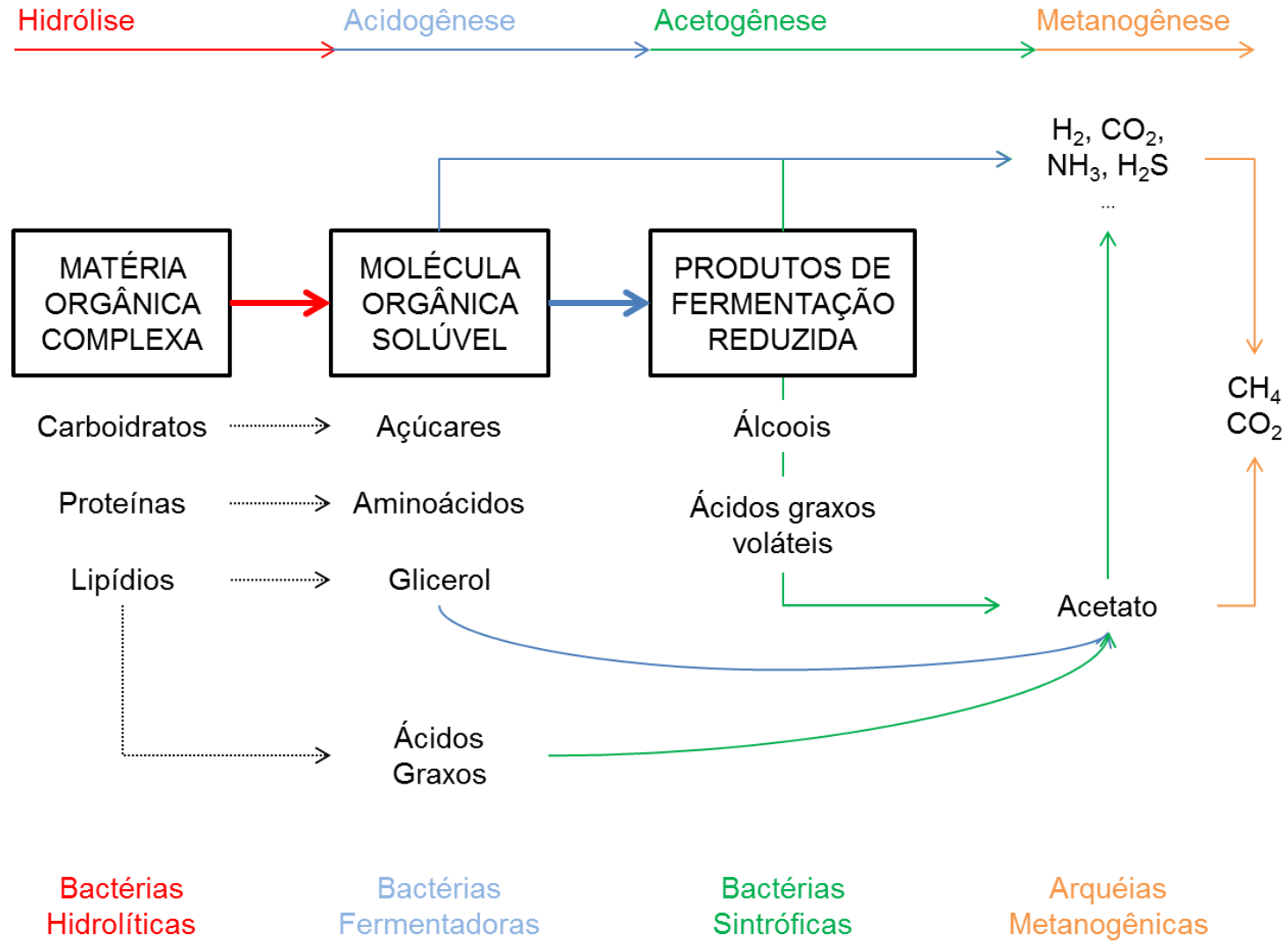
bactérias do consórcio anaeróbio (GERARDI, 2006). A hidrólise é considerada por Van Haandel e Lettinga (1994) como um fator limitante na degradação anaeróbica da matéria orgânica, por permitir que o material hidrolisado tenha o processo de difusão para interior dos microrganismos facilitado (GERARDI, 2003).

Durante a acidogênese, que é a segunda etapa da digestão anaeróbia, o material hidrolisado e solúvel é convertido em ácidos graxos voláteis de cadeia curta (AGV). Esta ação é realizada por bactérias fermentativas acidogênicas e tem como principais produtos ácidos (fórmico, acético, propiônico, butírico, valérico, isovalérico, láctico e succínico) e gases (hidrogênio - H_2 e dióxido de carbono - CO_2). Já na acetogênese, as bactérias acetogênicas atuam sobre os AGVs durante o seu processo fermentativo e como produtos, temos: acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (GERARDI, 2003).

A última etapa é a metanogênese, durante esta fase arqueias metanogênicas irão converter os produtos da fase anterior (acetogênese) a metano. A conversão de acetato, hidrogênio e dióxido de carbono a metano é denominado biometanização, e pode ser realizado por arqueias metanogênicas acetoclásticas que utilizam o acetato como substrato, por arqueias hidrogenotróficas que utilizam H_2 e CO_2 como substratos ou ainda por arqueias metilotróficas que utilizam o metanol como substrato (GERARDI, 2003).

Em função desta atividade consorciada de conversão, a origem do inóculo é de extrema importância, pois é necessária a presença de microrganismos adaptados ao substrato, principalmente no que se refere ao acesso inicial (hidrólise da celulose e hemicelulose) e presença de contaminantes tóxicos (ex. lignina).

Figura 1: Etapas da digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de CABEZAS et al., 2015.

1.3 INÓCULO

Para que a digestão anaeróbia seja eficiente é necessário a presença de um consórcio microbiano sintrófico, de modo que a degradação do substrato ocorra. Ainda que, o esperado seja o emprego de um inóculo advindo de um sistema semelhante a finalidade do trabalho (AMARAL et al., 2008), é essencial o estudo de novos inóculos distintos que se adequem melhor ao substrato em uso.

Compreender a origem do inóculo é importante, pois é necessário conhecer a dinâmica de adaptabilidade do mesmo a diferentes substratos. Além disso, entender a composição microbiana desse meio também é um elo forte a fim de melhorar a eficiência no tratamento em que esse for empregado. Fontes conhecidas como lodo proveniente de estações de tratamento de esgotos, de tratamento de efluentes industriais e de origem animal como rúmen, estrume bovino, suíno e de frango são promissoras, visto que são abundantes em microrganismos anaeróbios e qualificados para agilizar o tempo de biodegradação da matéria orgânica, portanto reduzindo a fase inicial de aclimatação – *lag* (GRIFFIN et al., 1998; FORSTER-CARNEIRO et al., 2004; SOUTO, 2005; FERNÁNDEZ-GÜELFO, 2008; BARCELOS, 2009; KHALID et al., 2011; ELBESHBISHY; NAKHLA; HAFEZ, 2012).

Assim, utilizar inóculos oriundos de rúmen e ou estrume bovino garante vantagens quando comparado a outros, dado que, estes estão adaptados a elevadas concentrações de lignina, celulose e hemicelulose, elementos presentes na dieta desses animais (HU; YU, 2005; YUE; LI; YU, 2013; AZEVEDO et al., 2015; YANG et al., 2015). Portanto, um inóculo constituído por uma variedade de microrganismos pode fornecer atividades hidrolíticas específicas e metanogênicas (ANGELIDAKI et al., 2009) importantes etapas para a produção de biogás.

A associação de um consórcio de microrganismos e substratos pode favorecer a conversão de substrato lignocelulósico a metano, além de reduzir a fase *lag*, reduzir o acúmulo de ácidos graxos voláteis e beneficiar o equilíbrio do meio (FOX; NOIKE; OHKI, 2003; LOZECZNIK et al., 2010). Reforçando a ideia da necessidade de compreender a organização e o comportamento da complexa rede microbiana para otimização do funcionamento e estabilização do processo (WIRTH et al., 2012).

Neste contexto os estudos microbiológicos clássicos para identificação da diversidade que compõe determinada amostra compreende o isolamento e identificação de cepas puras e isoladas advindas do meio. Certamente, o emprego dessa técnica não retrata a totalidade da composição microbiana ali representada, nem quando se objetiva o entendimento da complexidade microbiana e suas relações em um sistema (WIRTH et al., 2012). Portanto, necessita-se de técnicas mais robustas para encontrar tais repostas.

1.4 A BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA O ENTENDIMENTO DA ECOLOGIA MICROBIANA

Buscando entender melhor os processos e os indivíduos envolvidos, os novos métodos biomoleculares surgem como ferramentas alvo para localização de respostas chaves na compreensão da relação de eficiência de um tratamento. Uma dessas técnicas inovadoras é respaldada pelo Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) utilizada para distintas finalidades. Desta maneira, a metagenômica descrita por Handelsman et al. (1998) consiste na obtenção de sequências de DNA e eventuais funções de genomas microbianos comuns, presentes em amostras ambientais.

Essa técnica foi elaborada com a finalidade de fornecer aporte técnico na compreensão da diversidade, riqueza e abundância de microrganismos, dado que as técnicas fundamentadas na microbiologia clássica, pouco eram capazes de representar toda a dinâmica presente na comunidade advinda de uma amostra ambiental, dado que nem todos os microrganismos são cultiváveis em escala laboratorial (HANDELSMAN, 2004). Portanto, essa técnica permite a identificação de todos ou quase todos os microrganismos presentes. O desenvolvimento dessa técnica e seu uso cada vez mais exponencial dentro dos laboratórios permitiram a redução do custo da técnica tornando-a acessível, o que a tornou um grande atrativo para a comunidade científica (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil se destaca na produção de cana-de-açúcar para a indústria sucroalcooleira, após a produção há uma grande geração de resíduos (bagaço) que muitas vezes são destinados à queima (BAÊTA, 2016). Porém, devido ao seu alto teor de açúcares, alternativas ao uso do excedente deste bagaço têm sido consideradas, sendo uma delas a produção de combustíveis de 2ª geração (2G), tal como o gás metano (HOFSETZ; SILVA, 2012). A produção biológica de metano ocorre pela ação conjunta e consorciada de diferentes microrganismos com habilidades metabólicas distintas, a fim de promover a conversão da celulose e hemicelulose a metano (AKSHAYA et al., 2016). Estes microrganismos estão usualmente presentes em ambientes anaeróbios, porém sob diferentes composições (AMARAL et al., 2008). O sucesso da produção de metano via bagaço de cana-de-açúcar depende da habilidade inicial dos microrganismos acessarem os substratos nas fibras lignocelulósicas (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000). A busca por inóculos eficientes em tal conversão tem sido alvo de muitos estudos (WIRTH et al., 2012). Logo, a vantagem de usar um inóculo a partir de rúmen ou estrume bovino é que eles são adaptados aos substratos contendo lignina, celulose e hemicelulose presentes nos resíduos lignocelulósicos (GRIFFIN et al., 1998; FORSTER-CARNEIRO et al., 2004; SOUTO, 2005; FERNÁNDEZ-GÜELFO, 2008; BARCELOS, 2009; KHALID et al., 2011; ELBESHISHY; NAKHLA; HAFEZ, 2012). Por isso, testes com o consórcio microbiano dos inóculos distintos (lodos anaeróbios, estrume e rúmen bovinos) melhores adaptados podem proporcionar melhorias na biodegradação anaeróbia do bagaço de cana e, conseqüentemente, levar a aumentos no rendimento de produção de metano. Desta forma, torna-se importante o conhecimento da comunidade microbiana presente nos inóculos investigados a fim identificar a melhor composição para otimizar a inoculação em futuros reatores, visando escala real, aplicados a biometanização de material lignocelulósico para obtenção do máximo rendimento possível.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a composição microbiana em ensaios de degradação anaeróbia a partir de inóculos distintos visando a produção de metano.

3.2 ESPECÍFICO

- Comparar a produção de metano utilizando ensaios com três diferentes inóculos (lodo anaeróbio, lodo anaeróbio + rúmen, lodo anaeróbio + esterco);
- Identificar os microrganismos presentes nos reatores com os diferentes inóculos;
- Comparar o efeito da diversidade microbiana nos distintos reatores.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O inóculo UASB foi adquirido a partir do reator anaeróbio instalado no Centro de Pesquisa e Treinamento em Saneamento – CePTS – UFMG/COPASA, localizado na estação Arrudas, Belo Horizonte, MG. Esse reator é alimentado com esgoto sanitário. O inóculo UASB acrescido de rúmen bovino foi constituído pela mistura de 50% (m/m) de sólidos voláteis (SV) do primeiro inóculo com a inserção 50% de SV de microrganismos extraídos direto do rúmen bovino (cedido pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa). E, por fim, o inóculo UASB acrescido de estrume bovino foi constituído de 50% de SV do primeiro inóculo e adicionado 50% de SV de estrume bovino fresco.

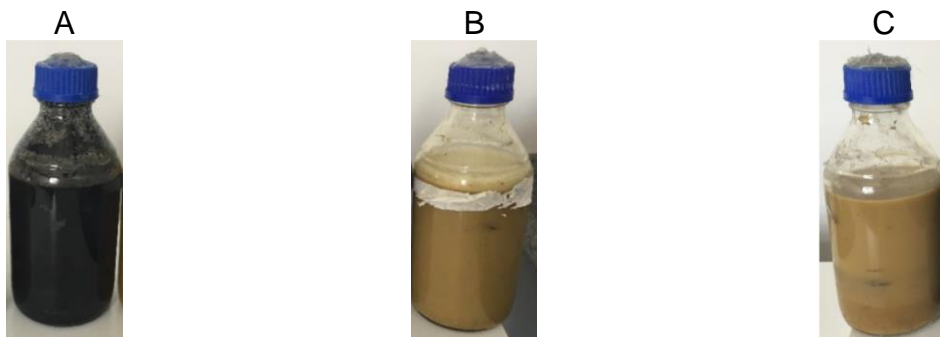
Foi, portanto, avaliado os três inóculos anaeróbios de fontes diferentes visando maximizar a biometanização do bagaço de cana, é apresentado no Quadro 1 e na Figura 2 os inóculos usados no presente estudo.

Quadro 1: Inóculos utilizados

Reator	Inóculo	Sigla	Resíduo
I	UASB	UASB	Bagaço bruto
II	UASB + RÚMEN	UASB-BR	Bagaço bruto
III	UASB + ESTRUME	UASB-FBM	Bagaço bruto

Fonte: próprio autor.

Figura 2: Inóculos utilizados para a produção de biogás a partir do bagaço da cana-de-açúcar pela digestão anaeróbia



(A) UASB (B) UASB-BR (C) UASB-FBM.

Fonte: LIMA, 2018.

O metano produzido foi monitorado ao longo de 100 dias. Todos os resultados de produção de metano foram normalizados (25 °C e 1 atm) e expressos em $NL_{CH_4} / kg \cdot sv^{-1}$.

4.2 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE METANO

Os ensaios de digestão anaeróbia para produção de metano foram executados em batelada e utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar. Este ensaio foi realizado nas dependências do Laboratório de Química Tecnológica e Ambiental (LQTA) da UFOP, sob coordenação do Prof. Dr. Sérgio Aquino, e constitui parte integrante da tese de doutorado do aluno Diego Roberto Sousa Lima.

Foram realizados em duplicata, em frasco 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*). Esses frascos foram incubados a $35 \text{ °C} \pm 0,3$ e 150 RPM em *shaker* (Thoth®, modelo 6440) pelo tempo necessário ao encerramento da produção de biogás. O biogás produzido foi quantificado diariamente e o metano foi analisado por meio do cromatógrafo de fase gasosa (CG) (Shimadzu®, modelo 2014/TCD).

As amostras de lodo foram coletadas antes e ao final de cada ensaio dos reatores de SS-AD e foram lavadas e preparadas para análise.

4.3 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Alíquotas de 20 mL de cada amostra (lodo dos três inóculos e ao final dos três ensaios) foram inicialmente centrifugadas a 5000 RPM por 10 minutos para separação da fração líquida e sólida. A fração líquida foi descartada e o material sedimentado, o *pellet*, foi lavado em tampão fosfato salino (PBS 1X) para remoção em maior parte de impurezas e também em menor escala de ácidos nucleicos extracelulares, centrifugado novamente conforme descrito anteriormente e descartado o sobrenadante, permanecendo com o *pellet*. O material foi armazenado a -20 °C para análises posteriores.

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

4.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração do DNA genômico das amostras foi feita de acordo com o protocolo estabelecido comercialmente pelo *DNeasy PowerSoil Kit* - QIAGEN™ (Apêndice A). No qual foram extraído o DNA das amostras antes e depois do ensaio de biometanização do bagaço da cana-de-açúcar. E em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer (-20 °C) até a utilização para a próxima etapa.

4.4.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Em seguida a extração do DNA, as amostras foram encaminhadas para a quantificação e constatação da pureza utilizando espectrofotômetro tipo NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, USA) na condição de comprimento de onda A260/280 nm. E por fim, foi executado uma eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 3 µL de brometo de etídeo, corridos em PBS 1x, sob o tempo de 30 minutos em 90 V, para confirmação da qualidade do DNA. Ao término da corrida da eletroforese, o gel foi fotodocumentado sob luz ultravioleta.

4.4.3 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO GENE DNAr 16S

Após as etapas de extração e quantificação, o gene ribossomal 16S foi amplificado, pela utilização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram então utilizado as seguintes sequências de oligonucleotídeos: senso 5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3' e antisenso 5' CCGTCAATTYYTTTRAGTTT 3' para amplificar a região variável V3. Uma sequência denominada *barcode* foi adicionada aos *primers* para identificação e separação das amostras durante o sequenciamento, sendo um *barcode* utilizado para cada amostra (Tabela 1).

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos (em azul) ligados ao *barcode* (em preto) e adaptador (em vermelho) que foram usados

BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG	AAGAGGATT	CGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
BC04	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA		
BC06	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA		
BC07	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTTCGTGCCAGCMGCCGCGGTAA		
BC08	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGATAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA		
BC10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGTGCCAGCMGCCGCGGTAA		

Fonte: adaptado de LEMES, 2018

As condições de PCR podem ser visualizados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Reagentes utilizados

Reagente	Volume (μL)
Água Milli-Q	Completar volume final
Buffer (10x)	3
DNA de cada amostra	20 (ng)
dNTP (10 mM)	1,13
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
Oligonucleotídeo (antisenso - 1 μM)	4,5
Oligonucleotídeo (senso - 1 μM)	4,5
Platinum [®] Taq (5 U/ μL) - Invitrogen	0,48
Volume final	30

Fonte: próprio autor.

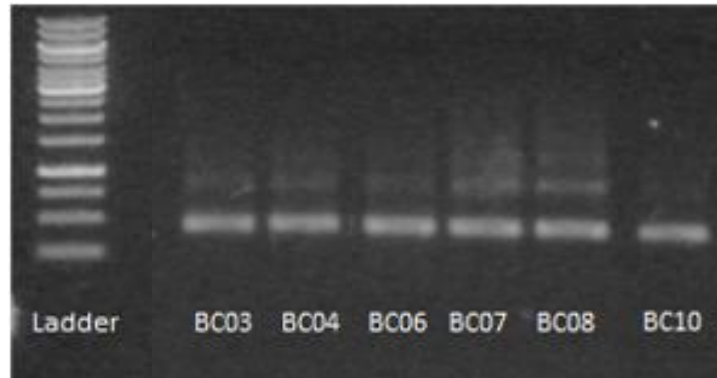
Tabela 3: Programação do termociclador (Biocycler[®])

Etapa	Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo
1 ^a	1	94	5'
2 ^a	35	94	30''
3 ^a	1	57	1'
4 ^a	1	72	1'
5 ^a	1	72	5'

Fonte: próprio autor.

Após o término da PCR os produtos (*amplicons*) foram conferidos quanto a qualidade por meio de uma eletroforese em gel de agarose 0,8% com 5 μL de *amplicons*. Em seguida, para a confirmação da qualidade dos *amplicons*, 22 μL foram purificados seguindo as orientações descritas no kit comercial *QIAquick[®] PCR Purification Kit*. E, por fim, foi avaliado novamente quanto a qualidade e integridade do produto em eletroforese sob as mesmas condições já descritas utilizando um volume de 2 μL do *amplicon* purificado (Figura 3).

Figura 3: Gel de eletroforese após a purificação de DNA



Fonte: próprio autor.

4.4.4 METAGENÔMICA PELO USO DA PLATAFORMA Ion Torrent®

Em parceria com o Laboratório Multiusuário de Genômica instalado no Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto sob orientação da técnica responsável Dr.^a Luíza Perucci, foi realizado o sequenciamento na plataforma Ion Torrent.

Foi necessário a quantificação da biblioteca de DNA, para isso, foi utilizado o kit Qubit dsDNA HS™ (High Sensitivity) no equipamento Qubit 2.0 fluorômetro (Life Technologies, USA) e, assim, normalizado as amostras para 70 pM. Na montagem da biblioteca, de cada amostra foram coletados 20 µL, adicionados em um único tubo do tipo Eppendorff e homogeneizado manualmente. O chip 318 v2™ (Life Technologies, USA) utilizado na análise foi carregado com 25 µL do *pool* de DNA e colocado no sequenciador Ion PGM™ (Life Technologies, USA). Para a leitura das amostras, utilizou-se os kits Ion PGM Hi-Q View Chef™ (Insumos) e Ion PGM Hi-Q View Sequencin™ (Life Technologies, USA). A baixa qualidade das *reads* (leituras) e sequencias policronais foram triadas pelo próprio sistema do equipamento (PMG) e os resultados alcançados foram exportados em formato FastQ.

4.5 ANÁLISE DOS DADOS

4.5.1 FÍSICAS E QUÍMICAS

As análises foram cedidas pelo Diego Roberto Sousa Lima, doutor formado em 2018 pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental que teve como resultado final de seu doutorado a tese intitulada de “Avaliação de rotas tecnológicas para o aproveitamento energético do bagaço de cana-de-açúcar”, disponível nas versões impressa e *on-line* no repositório da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.5.2 BIOLÓGICOS

Para comparação da diversidade microbiana presente antes e depois do ensaio de degradação anaeróbia, foram empregados testes estatísticos de similaridade e construção de gráficos de composição para filo, família e gênero pelos *softwares* Minitab 18[®] e Graphic Pad[®], respectivamente, a partir dos resultados obtidos do *default* da plataforma utilizada. Além disso, foi utilizada a plataforma Kegg[™] para elucidar as possíveis rotas metabólicas dos microrganismos identificados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO DE METANO

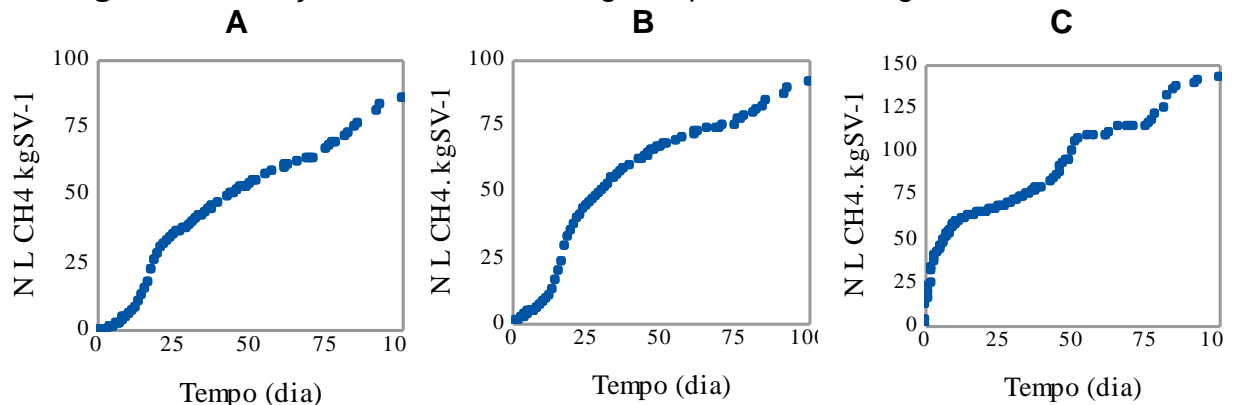
Os resultados apresentados na Tabela 4 demonstram que para os três inóculos avaliados, o inóculo com lodo anaeróbico enriquecido com estrume bovino (UASB-FBM) promoveu a maior produção de metano ($143,3 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg. sv}^{-1}$). Essa adição de estrume proporcionou um aumento de 67% na produção de metano quando comparada com a produção do inóculo anaeróbico do UASB ($85,6 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg. sv}^{-1}$). Já a adição de microrganismos presentes no rúmen bovino (UASB-BR) proporcionou um aumento de 17% na biometanização do bagaço de cana, produzindo $100,0 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg. sv}^{-1}$. Os comportamentos da biometanização do bagaço nas três condições estudadas estão apresentados na Figura 4. Observa-se que o enriquecimento do lodo com estrume bovino não apenas promoveu a maior produção acumulada de metano, como também promoveu uma imediata resposta de produção notada pela ausência de uma fase de adaptação (fase *lag*) presente nos outros inóculos.

Tabela 4: Teor de sólidos totais no experimento e produção acumulada de metano para cada inóculo utilizado

Tipo de Inóculo	Sólidos Totais (%)	CH ₄ (NL _{CH₄} /kg. sv ⁻¹)
UASB	15,6 (± 0,1)	85,6 (± 2,8)
UASB-BR	17,1 (± 0,2)	100,0 (± 3,6)
UASB-FBM	15,6 (± 0,4)	143,3 (± 4,9)

Fonte: LIMA, 2018.

Figura 4: Produção de metano ao longo do processo de digestão anaeróbica



(A) UASB (B) UASB-BR (C) UASB-FBM

Fonte: LIMA, 2018.

O desempenho do reator que continha microrganismos presentes no rúmen bovino (UASB-BR) foi semelhante ao do UASB para a produção de metano. Pela adição dessa microbiota nota-se que houve um aumento de 17% na biometanização do bagaço da cana-de-açúcar ($100 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg} \cdot \text{sv}^{-1}$). A adição de microrganismos ruminais e suas potencialidades já foram descritos na literatura, bem como a utilização de outros substratos, cita-se como exemplo o milho (KIVAISI; ELIAPENDA, 1995) e a casca de arroz (CAMP et al., 1988).

A habilidade desses microrganismos presentes no rúmen bovino de degradar materiais lignocelulósicos, está intimamente relacionado ao aumento da geração de metano, dado que estão relacionados a um ambiente rico desse substrato advindo da dieta desses animais. Na literatura trabalhos de Bayané e Guiot (2011) e de Jami e Mizrahi (2012) evidenciam que o consórcio microbiano anaeróbio presente em rúmen bovino torna-se efetivo na produção de enzimas hidrolíticas como as celulases, hemicelulases e ligninases. Apesar disso, esse acréscimo não ocasionou melhorias na fase *lag*, dado que a mesma se manteve evidente portanto, na mesma proporção que a do inóculo UASB.

No caso da adição do inóculo contendo UASB acrescido de estrume bovino (UASB-FBM) houve maior biometanização do substrato cana-de-açúcar. Ocorreram três aspectos relevantes: redução da fase *lag*; aumento de 67% na produção de metano por meio do bagaço bruto quando comparada ao inóculo UASB e, por fim, rendimento em dobro na taxa de produção de $3,05 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg} \cdot \text{sv}^{-1}$ dia.

Destaca-se que a esse experimento foi realizado em 100 dias, e que a adição de microrganismos oriundos do estrume bovino proporcionou uma produção de metano de aproximadamente $100 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg} \cdot \text{sv}^{-1}$ em 50 dias. Quando comparado aos demais inóculos, a produção não alcançou $100 \text{ NL}_{\text{CH}_4}/\text{kg} \cdot \text{sv}^{-1}$ durante todo o tempo utilizado no experimento (100 dias).

O estudo de Bah e colaboradores (2014) demonstrou que a ausência da fase *lag* no processo de biometanização de fibra de palma também se deu devido a presença do estrume bovino, ressaltaram que a utilização desse inóculo apresentou vantagens econômicas na degradação anaeróbia. Outros autores como AWAIS e colaboradores (2016) utilizando outros substratos como grama e palha de trigo

acrescidos do estrume bovino elucidaram as mesmas vantagens. Em resíduo sólido urbano Foster-Carneiro (2007) constatou um caimento de 20 a 30 dias para 2 a 5 dias utilizando o mesmo inóculo. Portanto, o estrume bovino destaca-se como potencial inóculo em fermentações SS-AD em biorrefinarias. Estados Unidos e Alemanha despontam na utilização desse substrato em processos industriais, SS-AD para geração de energia sustentável (SIMS et al., 2016).

5.2 ENSAIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Pela análise do sequenciamento de nova geração utilizando o gene do DNAr 16S foi possível classificar os microrganismos em dois domínios Bacteria e Archaea.

O domínio Bacteria é constituído por um grupo variado de bactérias, uma vez que apresentam inúmeras características distintas: fisiologia, morfologia, adaptação a ambientes extremos, filogenia, divisão celular, mecanismos de resistência e patogenicidade, entre outros (MADIGAN et al., 2016). Já o domínio Archaea engloba as arqueias e um filo principal de ambientes anaeróbios que é o Euryarchaeota, composto pelos microrganismos metanogênicos.

Pela limitação da técnica empregada em virtude da cobertura do chip utilizado na análise metagenômica permitiu apenas a identificação a nível de filo, família e gênero e esses microrganismos foram classificados em seus respectivos níveis taxonômicos que podem ser visualizados no Quadro 2. Identificou-se um total de 10 filios, 43 famílias e 24 gêneros.

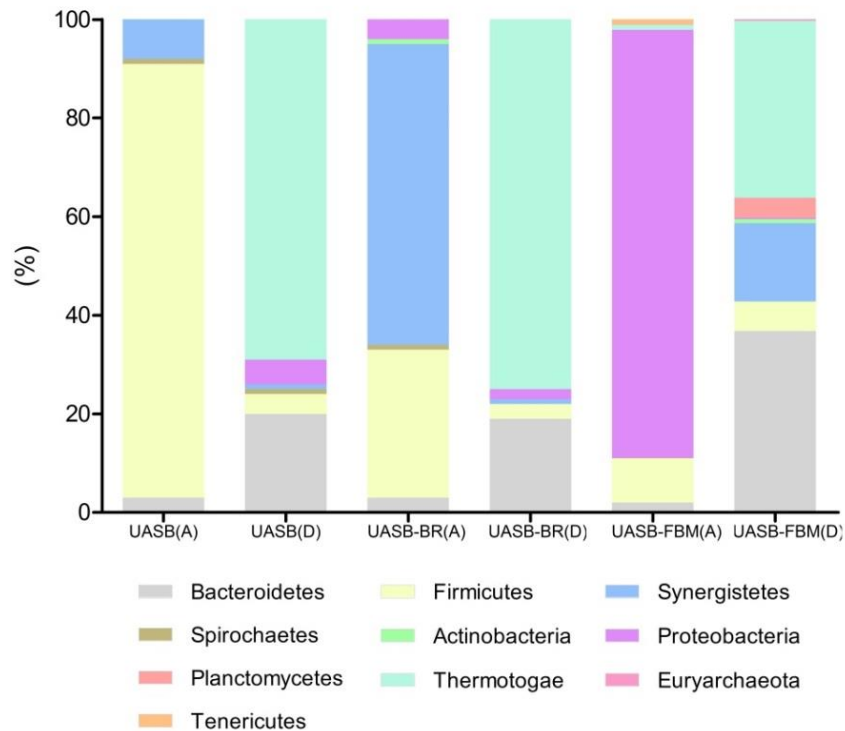
Quadro 2: Classificação dos grupos encontrados pela análise metagenômica

DOMÍNIO	FILO	FAMÍLIA	GÊNERO
Bacteria	Actinobacteria	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>
		Patulibacteraceae	
	Bacteroidetes	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>
		Blattabacteriaceae	
		Cytophagaceae	
		Flavobacteriaceae	
		Marinilabiliaceae	
		Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>
		Porphyromonadaceae	
		Rikenellaceae	<i>Ruminofillibacter</i>
		Sphingobacteriaceae	
		Firmicutes	Bacillaceae
	Catabacteriaceae		
	Clostridiaceae		<i>Clostridium</i>
	Erysipelotrichaceae		<i>Turicibacter</i>
	Eubacteriaceae		
	Gracilibacteraceae		
	Lachnospiraceae		
	Leuconostocaceae		<i>Leuconostoc</i>
	Peptococcaceae		
	Peptostreptococcaceae		<i>Intestinibacter</i>
	Planococcaceae		<i>Rummeliibacillus</i>
	Ruminococcaceae		<i>Ruminococcus</i>
	Thermoanaerobacteraceae		<i>Syntrophaceticus</i> <i>Treponema</i> <i>Saccharofermentans</i> <i>Soehngenia</i>
	Proteobacteria	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>
		Bradyrhizobiaceae	<i>Bosea</i>
		Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>
		Caulobacteraceae	<i>Brevundimonas</i>
		Desulfobacteraceae	
		Desulfovibrionaceae	
		Ectothiorhodospiraceae	
		Hyphomicrobiaceae	<i>Blastochloris</i>
		Oxalobacteraceae	
Rhodocyclaceae			
Sphingomonadaceae	<i>Sphingobium</i> <i>Azonexus</i>		
Spirochaetes	Spirochaetaceae		
	Synergistetes	Synergistaceae	<i>Aminobacterium</i>
		Thermotogae	Thermotogaceae
	Planctomycetes	Phycisphaeraceae	
	Tenericutes	Acholeplasmataceae	
		Mycoplasmataceae	
Spiroplasmataceae			
Archaea	Euryarchaeota	Methanobacteriaceae	<i>Methanobacterium</i> <i>Methanobrevibacter</i>

Fonte: próprio autor.

Foi obtido como resultado a taxa de distribuição microbiana, em porcentagem, encontrada para filo, família e gênero em cada tratamento. As Figuras 6, 7 e 8 e as tabelas respectivas, ilustram essas hierarquias e mostram quais foram as descobertas.

Figura 5: Taxa de distribuição microbiana para filo em diferentes tratamentos antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização



Fonte: próprio autor.

Tabela 5: Presença/ausência dos filamentos microbianos nos diferentes reatores antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização

FILO	REATOR					
	UASB (A)	UASB (D)	UASB-BR (A)	UASB-BR (D)	UASB-FBM (A)	UASB-FBM (D)
Actinobacteria			X			X
Bacteroidetes	X	X	X	X	X	X
Firmicutes	X	X	X	X	X	X
Planctomycetes						X
Proteobacteria		X	X	X	X	X
Spirochaetes	X	X	X		X	
Synergistetes	X	X	X	X		X
Tenericutes					X	
Thermotogae		X		X	X	X
Euryarchaeota					X	

Fonte: próprio autor.

Comparando as amostras dos três diferentes inóculos (início), observa-se uma distinta composição microbiana em nível de Filo. A comunidade presente no reator que continha apenas lodo UASB foi dominada principalmente pelo filo Firmicutes (88%) que apresentou um decaimento significativo após o término do ensaio chegando a 4%, por outro lado, os filios menos presentes inicialmente Thermotogae (66%) e Bacteroidetes (20%) sobressaíram ao final de 100 dias. No inóculo acrescido de rúmen (UASB-BR), a comunidade dominante inicialmente foi o filo Synergistetes (61%) e Firmicutes (30%) e após término do ensaio os filios Thermotogae (75%) e Bacteroidetes (19%) dominaram. Já no inóculo com adição de estrume (UASB-FBM), o filo Proteobacteria (86%) e Firmicutes (9%) aparecem com maior frequência e, ao fim, o filo Proteobacteria é substituído pelos filios Synergistetes (16%), Thermotogae (36%) e Bacteroidetes (37%). Em todos os três experimentos foi possível observar a diferença entre a estrutura da comunidade microbiana ao início do experimento, entretanto, ao findar os 100 dias, a estrutura de UASB e UASB-BR apresentaram uma estrutura muito similar, por outro lado, a estrutura de UASB-FBM tanto inicial quanto final apresentaram uma estrutura distinta entre si e entre os demais.

A conversão da biomassa lignocelulósica é mais estudada no rúmen bovino em que os filios Fibrobacteres e Firmicutes se sobressaem na degradação anaeróbia desse material (KRAUSE et al., 2003). Entretanto, nossos resultados após 100 dias de biometanização não apresentam tal tendência dado que encontramos em maior frequência os filios Bacteroidetes e Thermotogae.

De acordo com Kougias (2018), Bacteroidetes são capazes de aderir e degradar a lignocelulose devido à presença de múltiplos módulos da família 6 de ligação a carboidratos nas proteínas beta-xilosidase e endoglucanase. Além disso, as espécies de Bacteroidetes apresentam relativa importância no processo de metanização termofílica da celulose (XIA et al., 2014).

O filo Thermotogae apresenta em seu metabolismo, de um modo geral, a metabolização de carboidratos complexos e simples, tais como açúcares do tipo sacarose, glicose, amido, celulose e xilana. Ainda em seu metabolismo podem degradar polissacarídeos em acetato, etanol, H₂ e CO₂ (BHANDARI; GUPTA, 2014; ITOH et al., 2016).

Pela limitação da técnica não foi possível identificar a presença de arqueias em maior volume, mas é sabido que é esse grupo que está intimamente relacionado à produção final de conversão do material lignocelulósico pela digestão anaeróbia ao biogás. Embora não tenha sido visível a identificação desse grupo, certamente há a presença deles principalmente no reator contendo UASB acrescido de estrume bovino corroborando com as elevadas concentrações de metano produzido ao final do ensaio. Mesmo assim a identificação do filo Euryarchaeota no reator UASB-FBM fornece uma luz no sentido da elevada produção de biogás uma vez que esse filo é composto por arqueias metanogênicas responsáveis pelo processo final de digestão anaeróbia (EVANS et al., 2019).

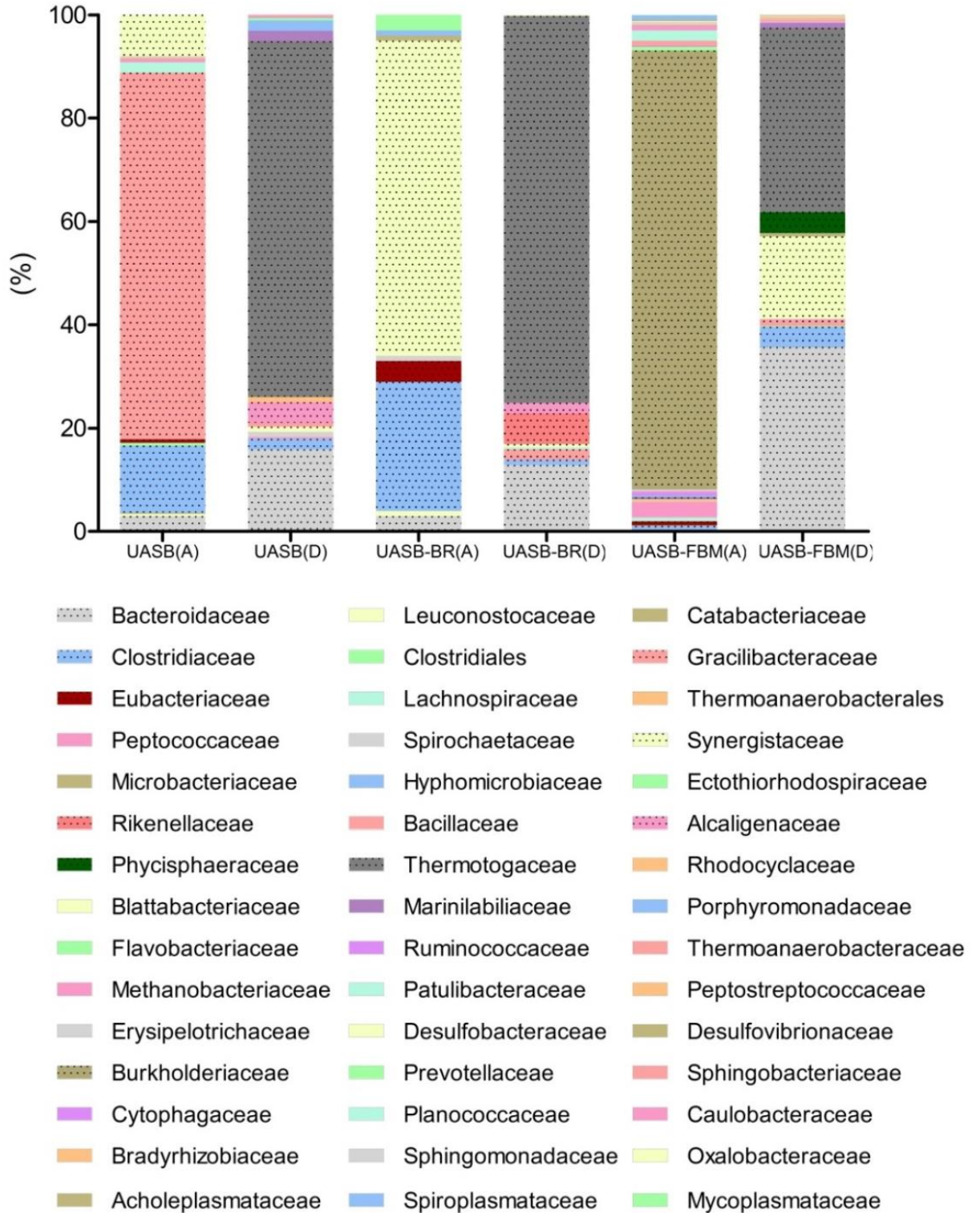
É apresentado na Figura 6 e na Tabela 6 os dados obtidos a nível de família para os três tipos de inóculos. Do primeiro filo têm-se a família dominante a Thermotogaceae, principalmente, nos ensaios inoculados com o lodo do UASB e lodo acrescido de estrume. No entanto, no ensaio acrescido de rúmem, a família Bacteroidaceae foi igualmente abundante à família Thermotogaceae, mostrando que a composição inicial do inóculo afetou a composição predominante no final do ensaio. Em todos os reatores após o ensaio a família Thermotogaceae apresentou maior dominância (Quadro 3).

Quadro 3: Dominância das famílias identificadas em cada reator

REATOR	FAMÍLIA	DOMINÂNCIA (%)
UASB (A)	Gracilibacteraceae	71
UASB (D)	Thermotogaceae	68,9
UASB-BR (A)	Synergistaceae	61
UASB-BR (D)	Thermotogaceae	74,9
UASB-FBM (A)	Burkholderiaceae	85
UASB-FBM (D)	Thermotogaceae	35,7

Fonte: próprio autor.

Figura 6: Taxa de distribuição microbiana para família em diferentes tratamentos antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização



Fonte: próprio autor.

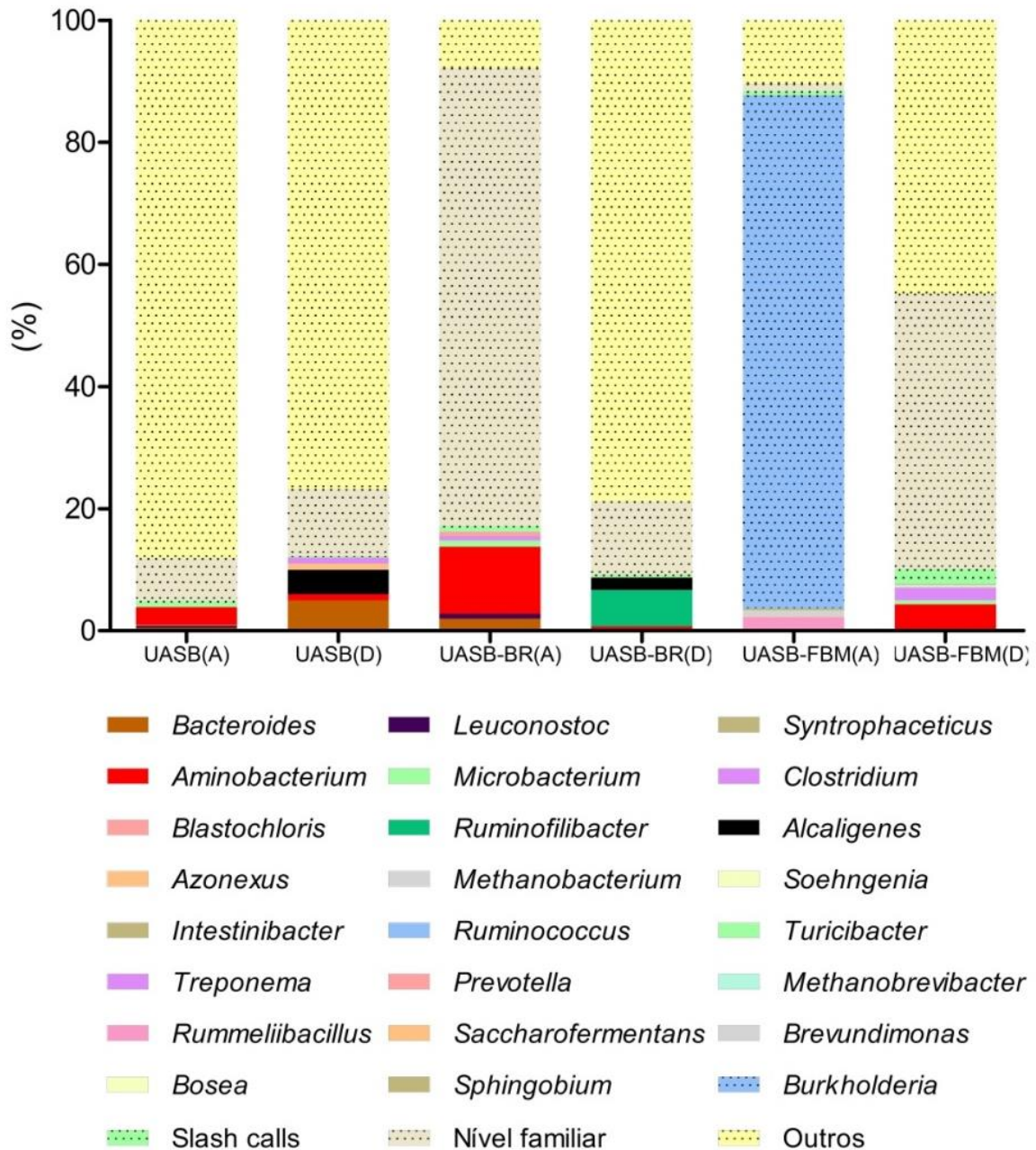
Tabela 6: Presença/ausência de famílias microbianas nos diferentes reatores antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização

FAMÍLIA	REATOR					
	UASB (A)	UASB (D)	UASB-BR (A)	UASB-BR (D)	UASB-FBM (A)	UASB-FBM (D)
Acholeplasmataceae					x	
Alcaligenaceae		x		x		
Bacillaceae		x			x	
Bacteroidaceae	x	x	x	x	x	x
Blattabacteriaceae				x		
Bradyrhizobiaceae					x	
Burkholderiaceae					x	
Catabacteriaceae	x					
Caulobacteraceae					x	
Clostridiaceae	x	x	x	x	x	x
Cytophagaceae					x	
Desulfobacteraceae						x
Desulfovibrionaceae						x
Ectothiorhodospiraceae			x			
Erysipelotrichaceae					x	x
Eubacteriaceae	x		x		x	
Flavobacteriaceae		x				
Gracilibacteraceae	x			x		x
Hyphomicrobiaceae			x			
Lachnospiraceae	x			x	x	
Leuconostocaceae	x		x			
Marinilabiliaceae		x				x
Microbacteriaceae			x			x
Mycoplasmataceae					x	
Oxalobacteraceae					x	
Patulibacteraceae						x
Peptococcaceae	x	x			x	x
Peptostreptococcaceae						x
Phycisphaeraceae						x
Planococcaceae					x	
Porphyromonadaceae		x			x	
Prevotellaceae					x	
Rhodocyclaceae		x				
Rikenellaceae				x		
Ruminococcaceae		x			x	x
Sphingobacteriaceae					x	
Sphingomonadaceae					x	
Spirochaetaceae	x	x	x		x	
Spiroplasmataceae					x	
Synergistaceae	x	x	x	x		x
Thermoanaerobacteraceae		x				x
Thermotogaceae		x		x	x	x
Methanobacteriaceae					x	x

Fonte: próprio autor.

Identificar os gêneros predominantes nas famílias poderia revelar diferenças metabólicas não observadas ao nível taxonômico maior, porém, a caracterização em nível de gênero não foi plenamente alcançada, conforme demonstrado na Figura 8 e Tabela 7, uma vez que a maioria das sequências não foram identificadas.

Figura 7: Taxa de distribuição microbiana para gênero em diferentes tratamentos antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização



Fonte: próprio autor.

Tabela 7: Presença/ausência de gêneros microbianos nos diferentes reatores antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização

GÊNERO	REATOR					
	UASB (A)	UASB (D)	UASB-BR (A)	UASB-BR (D)	UASB-FBM (A)	UASB-FBM (D)
<i>Alcaligenes</i>		x		x		
<i>Aminobacterium</i>	x	x	x	x		x
<i>Azonexus</i>		x				
<i>Bacteroides</i>	x	x	x	x		x
<i>Blastochloris</i>			x			
<i>Bosea</i>					x	
<i>Brevundimonas</i>					x	
<i>Burkholderia</i>					x	
<i>Clostridium</i>			x			x
<i>Intestinibacter</i>						x
<i>Leuconostoc</i>	x		x			
<i>Microbacterium</i>			x			x
<i>Prevotella</i>					x	
<i>Ruminococcus</i>						x
<i>Ruminofilibacter</i>				x		
<i>Rummeliibacillus</i>					x	
<i>Saccharofermentans</i>					x	
<i>Soehngenia</i>						x
<i>Sphingobium</i>					x	
<i>Syntrophaceticus</i>	x					
<i>Treponema</i>		x				
<i>Turicibacter</i>						x
<i>Methanobacterium</i>						x
<i>Methanobrevibacter</i>					x	

Fonte: próprio autor.

Dentro do que foi possível identificar ao nível de gênero, o gênero *Burkholderia* se mostrou presente e dominante no inóculo composto por reator UASB acrescido de estrume bovino. Esse gênero se caracteriza por integrar bactérias Gram-negativas e apresentam metabolismo aeróbio, além disso usam como reserva o polihidroxiacetato produzido por bactérias a partir do carbono do bagaço da cana-de-açúcar (PERIN; ARAUJO; REIS, 2006). Por serem saprófitas participam ativamente na degradação e reciclagem da matéria orgânica (PERIN; ARAUJO; REIS, 2006).

Na literatura Liew (2015) relata que o gênero *Burkholderia* é capaz de produzir lipases que se demonstraram eficientes na digestão anaeróbia de óleo de palma. Bem como produtoras de xilanases, enzimas importantes na quebra de xilanas presentes na hemicelulose vegetal que é o segundo polissacarídeo hemicelulósico

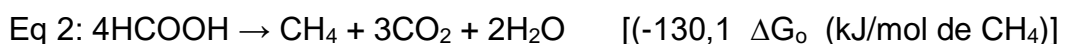
renovável mais abundante depois da celulose (MOHANA et al., 2008). Torna-se atraente, portanto, a utilização desse grupo nos reatores empregados para produção de enzimas que atuem sobre resíduos lignocelulósicos.

O gênero *Aminobacterium* foi detectado em todas as amostras, exceto no inóculo contendo UASB com estrume bovino. Caracteriza-se por ser um gênero de bactérias Gram-negativas, sésses, não formador de endósporos e bioquimicamente fermentam treonina, serina e glicina. Ressalta-se que este gênero não está ligada diretamente a degradação da matéria orgânica, mas compõem a microbiota típica de reator UASB (DELFORNO, 2011).

O gênero *Ruminofilibacter* foi favorecido ao longo do ensaio inoculado com lodo UASB acrescido de rúmen bovino e já foi reportado na literatura a habilidade de utilizar xilanas (WANG et al., 2017). Logo, este gênero apresenta-se como um potencial candidato a atuar na hidrólise do material lignocelulósico e, conseqüentemente, acelerar o processo de produção de metano.

E por fim, a presença dos gêneros *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter* são elementos chaves dado que são os constituintes responsáveis pela maior produção de biogás no reatores anaeróbios. Entretanto, como a análise dos nossos ensaios se deu na etapa inicial e final, não foi possível constatar em que momento estas arqueias começaram a aumentar a concentração, pois só foram detectadas na fase final.

De acordo com Laloui-Carpentier (2006) os gêneros encontrados de arqueia (*Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*) são pertencentes a família Methanobacteriaceae que são hidrogenotróficas. As duas equações (Eq) a seguir ilustram as possibilidade de rotas metabólicas para produção de metano por esses microrganismos, recorrendo ao hidrogênio ou ao álcool metanoico.



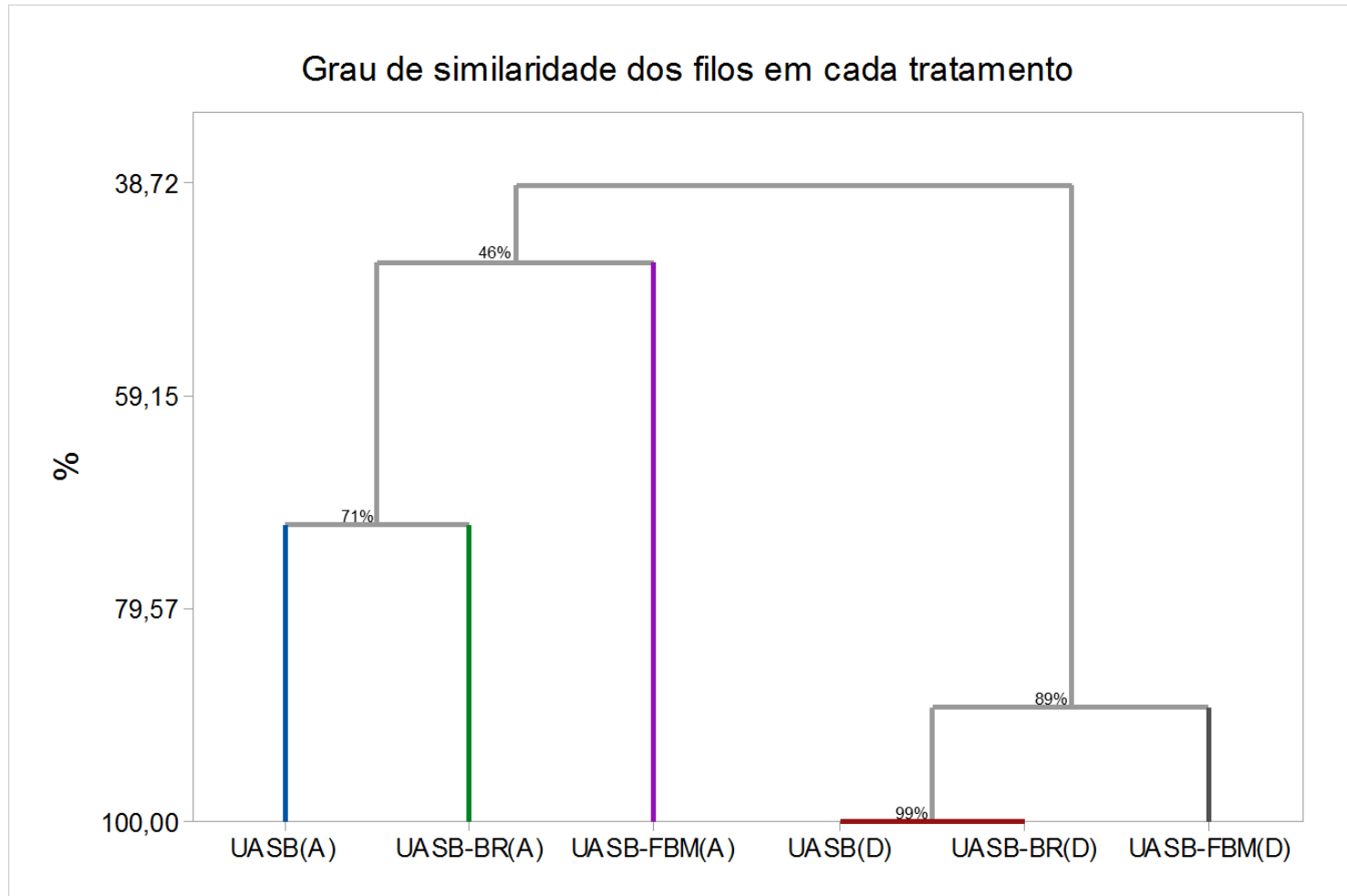
A rota metabólica que utiliza o hidrogênio como substrato é a que apresenta maior produção de energia. Portanto, reatores em que apresentam uma razão

eficiente entre carbono e nitrogênio favoreceria uma melhor produção de biogás ao final do ensaio.

Ainda sobre os gêneros encontrados, em reatores anaeróbios eles são comumente encontrados em aproximadamente 73% da composição microbiana (LECLERC; DELGÈNES; GODON, 2004). Já nossos reatores não apresentaram tal tendência o que pode ser explicado mais uma, vez, pela limitação dos dados obtidos.

Observa-se uma diferença considerável na composição microbiana inicial (Figura 8), em que destaca-se o reator UASB-FBM mais distante dos demais, apresentando apenas 46% de similaridade. Sendo que os inóculos que mais se assemelharam foram o UASB(A) e UASB-BR(A), em torno de 71% de similaridade. Quando comparado os reatores na fase final, há uma forte similaridade de filos microbianos no final dos ensaios inoculados com lodo UASB e UASB-BR (99%), sugerindo que apesar da diferente composição dos inóculos as condições do cultivo permitiram enriquecer organismos dos mesmos filos. Ainda dispare dos demais, o reator UASB-FBM (89%) apresentou enriquecimento de filos encontrados nos reatores UASB e UASB-BR.

Figura 8: Similaridade presente entre os tratamentos para filo antes (A) e após (D) o ensaio de biometanização



Fonte: próprio autor.

6 CONCLUSÃO

Os biorreatores são projetados para controlar e amplificar às reações bioquímicas que ocorrem na natureza em condições anaeróbias. Portanto, a investigação destes inóculos distintos que apresentam microrganismos adaptados não só ao substrato, como também as condições da digestão anaeróbia permitem identificar microrganismos importantes para a melhora da biometanização em rendimento e redução de tempo. Como pode ser visto, a adição de estrume ao lodo UASB promoveu uma rápida produção de metano, com ausência da fase *lag*, o que pode ter sido ocasionada pela presença inicial de microrganismos hidrolíticos e adaptados a materiais lignocelulósicos, provavelmente do filo Proteobacteria.

Os dados obtidos permitem afirmar que o inóculo UASB acrescido de estrume apresenta potencial para uma maior produção de biogás em menos tempo. É importante ressaltar que mais estudos devem ser feitos a fim de obter a identificação a nível de espécie de bactérias e arqueias para melhor compreensão das rotas metabólicas da produção de metano.

REFERÊNCIAS

- AKSHAYA, V. K.; PRANGYA, R. R.; PUSPENDU, B.; RAJESH, D. R. Anaerobic Treatment of Wastewater. In: NGO, H. H.; GUO, W.; SURAMPALLI, R. Y.; ZHANG, T. C. **Green Technologies for Sustainable Water Management**. Estados Unidos: American Society of Civil Engineers, 2016. p. 297 – 336.
- AMARAL, M. C. S.; FERREIRA, C. F. A.; LANGE, L. C.; AQUINO, S. F. Avaliação da biodegradabilidade anaeróbia de lixiviados de aterro sanitários. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 38–45, 2008.
- ANGELIDAKI, I.; ALVES, M.; BOLZONELLA, D.; BORZACCONI, L.; CAMPOS, J. L.; GUWY, A. J.; KALYUZHNYI, S.; JENICEK, P.; VAN LIER, J. B. Defining the biomethane potential (BMP) of solid organic wastes and energy crops: A proposed protocol for batch assays. **Water Science and Technology**, v. 59, n. 5, p. 927–934, 2009.
- AWAIS, M.; ALVARADO-MORALES, M.; TSAPEKOS, P.; GULFRAZ, M.; ANGELIDAKI, I. Methane Production and Kinetic Modeling for Co-digestion of Manure with Lignocellulosic Residues. **Energy and Fuels**, v. 30, n. 12, p. 10516–10523, 2016.
- AZEVEDO, A. C.; BENTO C. B. P.; RUIZ, J. C.; QUEIROZ, M. V.; MANTOVANI, H. C. Distribution and genetic diversity of bacteriocin gene clusters in rumen microbial genomes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7290–7304, 2015.
- BAÊTA, B. E. L.; LIMA, D. R. S.; ADARME, O. F. H.; GURGEL, L. V. A.; AQUINO, S. F. Optimization of sugarcane bagasse autohydrolysis for methane production from hemicellulose hydrolyzates in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 137–146, 2016.
- BAH, H.; ZHANG, W.; WU, S.; QUI, D.; KIZITO, S.; DONG, R. Evaluation of batch anaerobic co-digestion of palm pressed fiber and cattle manure under mesophilic conditions. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 1984–1991, 2014.

BARCELOS, B. R. Avaliação de diferentes inóculos na digestão anaeróbia da fração orgânica de resíduos sólidos domésticos. **Universidade de Brasília**, p. 89, 2009.

BAYANÉ, A.; GUIOT, S. R. Animal digestive strategies versus anaerobic digestion bioprocesses for biogas production from lignocellulosic biomass. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 43–62, 2011.

BHANDARI, V.; GUPTA, R. S. Molecular signatures for the phylum (class) Thermotogae and a proposal for its division into three orders (Thermotogales, Kosmotogales ord. Nov. and Petrotogales ord. Nov.) containing four families (Thermotogaceae, Fervidobacteriaceae fam. Nov., Kosmotoga. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 143–168, 2014.

BROWN, D.; SHI, J.; LI, Y. Comparison of solid-state to liquid anaerobic digestion of lignocellulosic feedstocks for biogas production. **Bioresource Technology**, v. 124, p. 379–386, 2012.

CABEZAS, A.; ARAUJO, J. C.; CALLEJAS, C.; GALÈS, A.; HAMELIN, J.; MARONE, A.; SOUSA, D. Z.; TRABLY, E.; ETCHEBEHERE, C. How to use molecular biology tools for the study of the anaerobic digestion process? **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 555–593, 2015.

CAMP, H. J. M. O. D.; VERHAGEN, F. J. M.; KIVAISI, A. K.; WINDT, F. E.; LUBBERDING, H. J.; GIJZEN, H. J.; VOGELS, G. D. Effects of lignin on the anaerobic degradation of (ligno) cellulosic wastes by rumen microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 408–412, 1988.

CONAB. Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar. Companhia Nacional de Abastecimento, 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso em: 05 de nov. de 2019.

DELFORNO, T. P. Caracterização microbiana e remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator EGSB. **Universidade de São Paulo**, p. 102, 2011.

ELBESHISHY, E.; NAKHLA, G.; HAFEZ, H. Biochemical methane potential (BMP) of food waste and primary sludge: Influence of inoculum pre-incubation and inoculum source. **Bioresource Technology**, v. 110, p. 18–25, 2012.

EVANS, P. N.; BOYD, J. A.; LEU, A. O.; WOODCROFT, B. J.; PARKS, D. H.; HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G. W. An evolving view of methane metabolism in the Archaea. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 219–232, 2019.

FERNÁNDEZ-GÜELFO, L. A. Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la forsu. efecto de diferentes pretratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. **Universidad de Cádiz**, p. 442, 2008.

FORSTER-CARNEIRO, T.; FERNÁNDEZ, L. A.; PÉREZ, M.; ROMERO, L. I.; ÁLVAREZ, C. J. Optimization of sebac start up phase of municipal solid waste anaerobic digestion. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 18, n. 4, p. 429–439, 2004.

FORSTER-CARNEIRO, T.; PÉREZ, M.; ROMERO, L. I.; SALES D. Dry-thermophilic anaerobic digestion of organic fraction of the municipal solid waste: Focusing on the inoculum sources. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 17, p. 3195–3203, 2007.

FOX, M. H.; NOIKE, T.; OHKI, T. Alkaline subcritical-water treatment and alkaline heat treatment for the increase in biodegradability of newsprint waste. **Water Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 77–84, 2003.

GERARDI, M. H. The Microbiology of Anaerobic Digesters. Nova Jersey: **John Wiley & Sons, Inc.**; 2003.

GERARDI, M. H. Wastewater Bacteria. Nova Jersey: **John Wiley & Sons, Inc.**; 2006.

GRIFFIN, M. E.; MCMAHON, K. D.; MACKIE, R. I.; RASKIN, L. Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters treating municipal solid waste and biosolids. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 3, p. 342–355, 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v. 5, n. 10, 1998.

HOFSETZ, K.; SILVA, M. A. Brazilian sugarcane bagasse: Energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564–573, 2012.

HU, Z. H.; YU, H. Q. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic fermentation of corn stover. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 7, p. 2371–2377, 2005.

ITOH, T.; ONISHI, M.; KATO, S.; IINO, T.; SAKAMOTO, M.; KUDO, T.; TAKASHINA, T.; OHKUMA, M. *Athalassotoga saccharophila* gen. Nov., sp. Nov., isolated from an acidic terrestrial hot spring, and proposal of Mesoaciditogales ord. nov. and mesoaciditogaceae fam. Nov. in the phylum Thermotogae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 1045–1051, 2016.

JAMI, E.; MIZRAHI, I. Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

KHALID, A. ARSHAD, M.; ANJUM, M.; MAHMOOD, T.; DAWSON, L. The anaerobic digestion of solid organic waste. **Waste Management**, v. 31, n. 8, p. 1737–1744, 2011.

KIVAISI, A. K.; ELIAPENDA, S. Application of rumen microorganisms for enhanced anaerobic degradation of bagasse and maize bran. **Biomass and Bioenergy**, v. 8, n. 1, p. 45–50, 1995.

KOUGIAS, P. G.; CAMPANARO, S.; TREU, L.; TSAPEKOS, P.; ARMANI, A.; ANGELIDAKI, I. Spatial distribution and diverse metabolic functions of lignocellulose-degrading uncultured bacteria as revealed by genome-centric metagenomics. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 18, p. 1–14, 2018.

KRAUSE, D. O.; DENMAN, S. E.; MACKIE, R. I.; MORRISON, M.; RAE, A. L.; ATTWOOD, G. T.; MCSWEENEY, C. S. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: Microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 5, p. 663–693, 2003.

LALOUÏ-CARPENTIER, W.; LI, T.; VIGNERON, V.; MAZÉAS, L.; BOUCHEZ T. Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 89, n. 3–4, p. 423–434, 2006.

LAMONICA, H. M. Potencial de geração de excedentes de energia elétrica com o biogás produzido a partir da biodigestão da vinhaça na indústria sucro-alcooleira brasileira. **Energy**, v. 0, p. 1–5, 2004.

LECLERC, M.; DELGÈNES, J. P.; GODON, J. J. Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 809–819, 2004.

LEMES, C. G. DE C. Diversidade metagenômica e potencial biotecnológico de cavernas de canga do Quadrilátero Ferrífero. **Universidade Federal de Ouro Preto**, p. 90, 2018.

LI, Y.; PARK, S. Y.; ZHU, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 1, p. 821–826, 2011.

LIEW, Y. X.; CHAN, J.; SHOW, P. L.; SIVAKUMAR, M.; CHONG, M. F. Enzymatic pre-treatment of Palm Oil Mill Effluent (POME) For Enhanced Anaerobic Digestion. Asia Pacific Confederation of Chemical Engineering Congress 2015: APCChE 2015, incorporating CHEMECA 2015, n. 3133340, p. 1321–1331, 2015.

LIMA, D. R. S. Avaliação de rotas tecnológicas para o aproveitamento energético do bagaço de cana-de-açúcar. **Universidade Federal de Ouro Preto**, p. 276, 2018.

LOZECZNIK, S.; SPARLING, R.; OLESZKIEWICZ, J. A.; CLARK, S.; VANGULCK, J. F. Leachate treatment before injection into a bioreactor landfill: Clogging potential

reduction and benefits of using methanogenesis. **Waste Management**, v. 30, n. 11, p. 2030–2036, 2010.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. *Microbiologia de Brock*. 14ª ed. Porto Alegre: **Artmed**; 2016.

MAGALHÃES, P. S. G.; BRAUNBECK, O. A. "Sugarcane and Straw Harvesting For Ethanol Production". In: CORTEZ, L. A. B. *Sugarcane bioethanol — R&D for Productivity and Sustainability*. São Paulo: **Blucher**, p. 465 – 476, 2010..

MOHANA, S.; SHAH, A.; DIVECHA, J.; MADAMWAR, D. Xylanase production by *Burkholderia* sp. DMAX strain under solid state fermentation using distillery spent wash. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7553–7564, 2008.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Quimica Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.

PAIXÃO, M. C. S. Etanol na Paraíba: aumento das exportações e aspectos ambientais da produção. **Universidade Federal da Paraíba**, p. 110, 2009.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.

PERIN, L.; ARAUJO, J.; REIS, V. O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana. **Embrapa-CNPAB. Série Documentos**, v. 219, p. 1–18, 2006.

ROCHA, G. J. M.; NASCIMENTO, V. M.; GONÇALVES, A. R.; SILVA, V. F. N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015.

SIMS, R. C.; BEDINGFIELD, S. K.; THOMPSON, R.; SIMS, J. L. Bioenergy from wastewater-based biomass. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 1, p. 103–124, 2016.

SOUTO, G. D. B. Efeito da variação gradual da taxa de recirculação do lixiviado em reatores anaeróbios híbridos na digestão da fração orgânica dos resíduos sólidos urbanos. **Universidade de São Paulo**, p. 115, 2005.

SOUZA-CORREIA, J. A.; RIDENTI, M. A.; OLIVEIRA, C.; ARAÚJO, S. R.; AMORIM, J. Decomposition of lignin from sugar cane bagasse during ozonation process monitored by optical and mass spectrometries. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 11, p. 3110–3119, 2013.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, 2012.

VAN HAANDEL, A.C.; LETTINGA, G. Tratamento Anaeróbio de Esgoto: um manual para regiões de clima quente. Campina Grande: **Universidade Federal da Paraíba**; 1994.

WANG, M.; ZHOU, J.; YUAN, Y. X.; DAI, Y. M.; LI, D.; LI, Z. D.; LIU, X. F.; ZHANG, X. Y.; YAN, Z. Y. Methane production characteristics and microbial community dynamics of mono-digestion and co-digestion using corn stalk and pig manure. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 8, p. 4893–4901, 2017.

WIRTH, R.; KOVÁCS, E.; MARÓTI, G.; BAGI, Z.; RÁKHELY, G.; KOVÁCS, K. L. Characterization of a biogas-producing microbial community by short-read next generation DNA sequencing. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–16, 2012.

XIA, Y.; WANG, Y.; FANG, H. H. P.; JIN, T.; ZHONG, H.; ZHANG, T. Thermophilic microbial cellulose decomposition and methanogenesis pathways recharacterized by metatranscriptomic and metagenomic analysis. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–9, 2014.

YANG, L.; XU, F.; GE, X.; LI, Y. Challenges and strategies for solid-state anaerobic digestion of lignocellulosic biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 824–834, 2015.

YUE, Z. B.; LI, W. W.; YU, H. Q. Application of rumen microorganisms for anaerobic bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 738–744, 2013.

ANEXO A

Quadro 4: Protocolo de extração de DNA genômico

nº	ETAPA
01.	Adicionou 0,25 g de amostra ao tubo <i>PowerBead</i> fornecido e levou ao vortex delicadamente para misturar.
02.	Adicionou 60 µL da solução C ¹ e levou ao vortex brevemente.
03.	Levou ao vortex na velocidade máxima por 10 min.
04.	Repetiu o passo anterior.
05.	Centrifugou os tubos a 10.000 x g por 30 s.
06.	Transferiu o sobrenadante para um tubo de coleta limpo de 2 mL.
07.	Adicionou 250 µL da solução C ² , agitou no vortex por 5 s e incubou a 5 °C por 5 min.
08.	Centrifugou os tubos por 1 min a 10.000 x g.
09.	Evitando o pallet, transferiu até 600 µL de sobrenadante para um tubo de coleta limpo de 2 mL.
10.	Adicionou 200 µL da solução C ³ e agitou no vórtex brevemente e incubou a 5 °C por 5 min.
11.	Centrifugou os tubos por 1 min a 10.000 x g.
12.	Evitando o pallet, transferiu até 750 µL de sobrenadante para um tubo de coleta limpo de 2 mL.
13.	Agitou para misturar a solução C ⁴ e adicione 1200 µL ao sobrenadante e levou ao vortex por 5 s.
14.	Colocou 675 µL em uma coluna de rotação MB e centrifugou a 10.000 x g por 1 min. Descartou o fluxo.
15.	Repetiu a etapa 14 duas vezes, até que toda a amostra tivesse sido processada.
16.	Adicionou 500 µL da solução C ⁵ e centrifugou por 30 s a 10.000 x g.
17.	Descartou o fluxo e centrifugou novamente por 1 min a 10.000 x g.
18.	Colocou cuidadosamente a coluna de rotação MB em um tubo de coleta limpo de 2 mL e evite espirrar qualquer solução C ⁵ na coluna.
19.	Adicionou 100 µL da solução C ⁶ ao centro da membrana branca do filtro.
20.	Centrifugou em temperatura ambiente por 30 s a 10.000 x g. Descartou a coluna de rotação do MB. O DNA foi extraído para o NGS.

Fonte: adaptado do protocolo disponível no kit *DNeasy PowerSoil Kit* - QIAGEN®.