



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE EM DIGESTATOS  
PRODUZIDOS EM DIGESTORES ANAERÓBIOS A PARTIR DE DIFERENTES  
RESÍDUOS SUÍNOS**

**JOÃO VICTOR PESSOA MAIA**

Foz do Iguaçu  
2024

**AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE EM DIGESTATOS  
PRODUZIDOS EM DIGESTORES ANAERÓBIOS A PARTIR DE DIFERENTES  
RESÍDUOS SUÍNOS**

**JOÃO VICTOR PESSOA MAIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Foz do Iguaçu

2024

JOÃO VICTOR PESSOA MAIA

**AVALIAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA PRESENTE EM DIGESTATOS  
PRODUZIDOS EM DIGESTORES ANAERÓBIOS A PARTIR DE DIFERENTES  
RESÍDUOS SUÍNOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
UNILA

---

Coorientadora: Marahia Isabel Guevara Robayo  
UNILA

---

Prof. Dra. Nathalia Correa Chagas de Souza  
UNILA

---

Prof. Dra. Deborah Catharine de Assis Leite  
UTFPR-DV

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.



## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho seria impossível sem o apoio e incentivo de muitas pessoas, às quais sou profundamente grato. Em primeiro lugar, minhas mães, Dagmar Aparecida e Marta Ramalho, aos meus pais, Sebastião Nunes, Vanderley Samuel e Rogério Pengoraro, minhas irmãs Millene e Jamille e meu tio Abraão Ramalho, agradeço à toda minha família pelo amor incondicional, pela paciência e por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos mais difíceis. Amo todos vocês.

À minha namorada Heveli, pelo carinho, compreensão e por estar ao meu lado durante todo esse processo, por toda paciência, sempre me motivando a seguir em frente. Obrigado por ser essa pessoa especial, solícita e por estar sempre ao meu lado. Te amo.

Agradeço, de forma especial, aos meus amigos Luiz Eduardo e Glauber Faria, com quem dividi momentos inesquecíveis enquanto morávamos juntos. A convivência com vocês tornou essa jornada mais leve e divertida, proporcionando muitas risadas, apoio mútuo e uma verdadeira amizade que levarei para sempre. Mesmo com a distância, meus grandes amigos Eric Oliveira, Jefferson Barboza e Bruno Oliveira sempre estiveram presentes, conversando ou jogando algo. A amizade de vocês, foi um suporte fundamental, trazendo palavras de incentivo e momentos de descontração, mesmo nos dias mais desafiadores. Sou muito grato por poder contar com vocês, independentemente da distância.

Aos meus grandes amigos da turma de Biotecnologia de 2019, em especial, Kauana Magagnin, Lia Bicudo, Gustavo França, Kauanny Isabelly e Isabella Lorena que tornaram essa jornada mais leve com suas companhias, troca de experiências e por estarem sempre dispostos a ajudar, tanto nos estudos quanto na vida pessoal. Sou muitíssimo grato por ter partilhado esses momentos com vocês.

Agradeço também à Cibiogás, por possibilitar a realização e desenvolvimento desse trabalho além do pelo suporte e pela flexibilidade concedida para que eu pudesse conciliar o trabalho com os estudos, sem os quais este trabalho não teria sido possível. Um agradecimento à equipe do Laboratório de Biogás, Franciele Natividade, Ana Caroline, Rafaela Meyer e Giovanna

Ghellere, são colegas incríveis, obrigado por ajudarem no meu desenvolvimento profissional.

Não poderia deixar de agradecer à UNILA, seus funcionários e aos motoristas do Intercampi que por diversas vezes me viram no correr para pegar o ônibus e me esperaram. Aos professores do curso de Biotecnologia, que me forneceram o conhecimento, o direcionamento e o apoio necessário para a conclusão deste trabalho. Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Michel Passarini pela orientação, paciência e pelas valiosas contribuições ao longo de toda a pesquisa.

Agradeço à minha coorientadora Marahia Isabel por dividir seus conhecimentos e me ajudar no desenvolvimento deste trabalho, sua ajuda foi fundamental para a elaboração do mesmo. Agradeço ao Alexander Colmenarez, que me deu apoio e suporte para conseguir finalizar este trabalho.

*"Um dia sem sorrir é um dia desperdiçado."*  
**Charlie Chaplin**

## RESUMO

Diante dos desafios globais relacionados às mudanças climáticas e à escassez de recursos energéticos não renováveis, a exploração de fontes de energia sustentáveis é de fundamental importância na busca por fontes renováveis como o biometano. Este gás renovável é obtido a partir da conversão de resíduos orgânicos, oferecendo uma solução inovadora para atender às crescentes demandas energéticas e, ao mesmo tempo, reduzir o impacto ambiental. O digestato, um subproduto da biodigestão de resíduos orgânicos, é transformado em um biofertilizante inodoro e isento de microrganismo prejudiciais. Isso não apenas enriquece o solo, mas também promove a proliferação de bactérias fixadoras de nitrogênio, beneficiando a agricultura sustentável. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biofertilizante de amostras provenientes de dois biorreatores anaeróbios: o BLC (carcaça suína + efluente suíno) e o CSTR (efluente suíno). As análises físico-químicas e microbiológicas, bem como a avaliação da diversidade microbiana, mostraram diferenças entre os digestatos. O BLC apresentou maior diversidade microbiana, com índices de Shannon (7,6) e Simpson (0,9955), sugerindo que a presença de carcaça suína favoreceu o desenvolvimento de uma comunidade mais equilibrada e diversa, essencial para a produção de um biofertilizante. Espécies benéficas, como *Bacillus* sp. (2,2%), *Paenibacillus* sp. (1,5%) e *Pseudomonas* sp. (1,9%), foram encontradas em maiores quantidades no BLC, desempenhando funções importantes na promoção do crescimento vegetal, fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo. No CSTR, embora as mesmas espécies estivessem presentes, suas proporções foram menores. A abundância de *Methanoculleus* no BLC (25,38%) foi maior que no CSTR (1-3%), devido à maior produção de hidrogênio e CO<sub>2</sub> no primeiro, destacando o papel fundamental dessas arqueias na produção de biogás. Além disso, o controle do pH mostrou-se crucial para maximizar a eficiência microbiana e garantir a qualidade do biofertilizante. Os resultados indicam que o digestato do BLC possui maior potencial como biofertilizante, com alta diversidade microbiana e gêneros promotores de crescimento. Entretanto, mais estudos são necessários para compreender a microbiota associada à biodigestão em processos de digestão anaeróbios utilizando resíduos suínos.

**Palavras-chave:** Biofertilizante; biometano; carcaça suína, arqueias, microbiota de digestato

## RESUMEN

Frente a los desafíos globales relacionados con el cambio climático y la escasez de recursos energéticos no renovables, la exploración de fuentes de energía sostenibles es de fundamental importancia en la búsqueda de fuentes renovables como el biometano. Este gas renovable se obtiene a partir de la conversión de residuos orgánicos, ofreciendo una solución innovadora para satisfacer las crecientes demandas energéticas y, al mismo tiempo, reducir el impacto ambiental. El digestato, un subproducto de la digestión anaeróbica de residuos orgánicos, se transforma en un biofertilizante inodoro y libre de microorganismos perjudiciales. Esto no solo enriquece el suelo sino que también promueve la proliferación de bacterias fijadoras de nitrógeno, beneficiando la agricultura sostenible. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial biofertilizante de muestras provenientes de dos biorreactores anaeróbicos: el BLC (carcasa de cerdo + efluente porcino) y el CSTR (efluente porcino). Los análisis físico-químicos y microbiológicos, así como la evaluación de la diversidad microbiana, mostraron diferencias entre los digestatos. El BLC presentó una mayor diversidad microbiana, con índices de Shannon (7.6) y Simpson (0.9955), sugiriendo que la presencia de carcasa de cerdo favoreció el desarrollo de una comunidad más equilibrada y diversa, esencial para la producción de un biofertilizante. Especies beneficiosas, como *Bacillus* sp. (2.2%), *Paenibacillus* sp. (1.5%) y *Pseudomonas* sp. (1.9%), se encontraron en mayores cantidades en el BLC, desempeñando funciones importantes en la promoción del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo. En el CSTR, aunque las mismas especies estaban presentes, sus proporciones fueron menores. La abundancia de *Methanoculleus* en el BLC (25.38%) fue mayor que en el CSTR (1-3%), debido a la mayor producción de hidrógeno y CO<sub>2</sub> en el primero, destacando el papel fundamental de estas arqueas en la producción de biogás. Además, el control del pH demostró ser crucial para maximizar la eficiencia microbiana y garantizar la calidad del biofertilizante. Los resultados indican que el digestato del BLC tiene mayor potencial como biofertilizante, con alta diversidad microbiana y géneros promotores del crecimiento. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender la microbiota asociada a los digestatos en procesos de digestión anaeróbica utilizando residuos porcinos.

**Palabras clave:** Biofertilizante; biometano; carcasa de cerdo, arqueas, microbiota de digestato

## ABSTRACT

Facing global challenges related to climate change and the scarcity of non-renewable energy resources, the exploration of sustainable energy sources is of fundamental importance in the search for renewable sources such as biomethane. This renewable gas is obtained from the conversion of organic waste, offering an innovative solution to meet the growing energy demands while reducing environmental impact. Digestate, a byproduct of anaerobic digestion of organic waste, is transformed into an odorless biofertilizer free of harmful microorganisms. This not only enriches the soil but also promotes the proliferation of nitrogen-fixing bacteria, benefiting sustainable agriculture. This study aimed to evaluate the biofertilizer potential of samples from two anaerobic bioreactors: the BLC (pig carcass + swine effluent) and the CSTR (swine effluent). Physicochemical and microbiological analyses, as well as the evaluation of microbial diversity, showed differences between the digestates. The BLC presented a higher microbial diversity, with Shannon (7.6) and Simpson (0.9955) indices, suggesting that the presence of pig carcass favored the development of a more balanced and diverse community, essential for the production of a biofertilizer. Beneficial species, such as *Bacillus* sp. (2.2%), *Paenibacillus* sp. (1.5%) and *Pseudomonas* sp. (1.9%), were found in higher quantities in the BLC, performing important functions in promoting plant growth, nitrogen fixation and phosphorus solubilization. In the CSTR, although the same species were present, their proportions were lower. The abundance of *Methanoculleus* in the BLC (25.38%) was higher than in the CSTR (1-3%), due to the higher production of hydrogen and CO<sub>2</sub> in the former, highlighting the fundamental role of these archaea in biogas production. Additionally, pH control was shown to be crucial to maximize microbial efficiency and ensure the quality of the biofertilizer. The results indicate that the digestate from the BLC has greater potential as a biofertilizer, with high microbial diversity and growth-promoting genera. However, further studies are needed to understand the microbiota associated with digestates in anaerobic digestion processes using swine waste.

**Keywords:** Biofertilizer; biomethane; swine carcass, archaea, digestate microbiota.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Diagrama do Processo de degradação de material orgânico em digestão anaeróbica	15
<b>Figura 2</b> – Biorreator de Lagoa coberta (BLC)	22
<b>Figura 3</b> – Central de Bioenergia de Toledo	23
<b>Figura 4</b> – Amostras em duplicata dos digestatos para sequenciamento	24
<b>Figura 5</b> – Pie chart da taxonomia de bactérias no BLC	29
<b>Figura 6</b> – Pie chart da taxonomia de bactérias no CSRT	30
<b>Figura 7</b> – Abundância relativa taxonômica dos filo do BLC e CSTR	31
<b>Figura 8</b> – Abundância relativa taxonômica dos gêneros do BLC e CSTR	32

### TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Análise dos físico-químicos do BLC e CSTR.	26
<b>Tabela 2</b> – Taxonomia do BLC e CSRT	27

### GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Curva de rarefação do BLC e CSTR	28
<b>Gráfico 2</b> – Quantidade de funções positivas encontradas nos biorreatores	35
<b>Gráfico 3</b> – Gêneros encontrado no BLC com funções benéficas como biofertilizante	36
<b>Gráfico 4</b> – Gêneros encontrado no CSTR com funções benéficas como biofertilizante	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLC	Biorreator de lagoa coberta
CH <sub>4</sub>	Metano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CSTR	<i>Continuous Stirred Tank Reactor model</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
g	grama
H <sub>2</sub>	Hidrogênio
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
K <sup>+</sup>	Potássio
kg	Quilograma
L	Litros
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mL	Mililitros
Nm <sup>3</sup>	Normal metro cúbico
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SF	Sólidos fixos
ST	Sólidos totais
SV	Sólidos voláteis
°C	Graus celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>14</b>
2.1 PRODUÇÃO DE BIOMETANO	14
2.2 BIODIGESTÃO	15
2.3 DIGESTATO	17
2.3.1 QUALIDADE DO DIGESTATO	17
2.4 MICROBIOMA DOS BIORREADORES	19
2.5 MAPEAMENTO GENÉTICO DO DIGESTATO	19
<b>3 OBJETIVO</b>	<b>21</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.1 OBJETIVO ESPECÍFICO	21
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>21</b>
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	21
4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ENSAIO DE SÓLIDOS	23
4.3 ACESSO A COMUNIDADE MICROBIANA DOS DIGESTATO	23
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
5.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICAS	25
5.2 DIVERSIDADE TAXONÔMICA NOS BIORREADORES	25
5.2.1 ESPÉCIES BENÉFICAS PARA BIOFERTILIZANTES	33
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes de energia sustentáveis tornou-se uma prioridade global diante dos desafios das mudanças climáticas e da escassez de recursos não renováveis (Angelidaki et al., 2018). Nesse contexto, o biometano surge como uma alternativa promissora, pois combina a produção de energia com a gestão de resíduos orgânicos, oferecendo uma abordagem inovadora para atender às crescentes demandas energéticas enquanto reduz o impacto ambiental (Nemmour et al., 2023).

Com essa perspectiva sustentável, em 2022, houve o registro de 114 novas instalações de biogás no Brasil, representando um crescimento de 15% em comparação com o ano anterior. Atualmente, o Brasil possui 936 instalações de biogás, com 885 delas em funcionamento, gerando cerca de 2,8 bilhões de metros cúbicos normais por ano ( $\text{Nm}^3/\text{ano}$ ) (Cibiogás, 2022).

O digestato é um subproduto que é biodigerido no biorreator, após a produção de biometano, o efluente residual, rico em nutrientes, é empregado como fertilizante orgânico nas áreas de cultivo e sistemas de irrigação. O biofertilizante, diferente dos dejetos que alimentam o biorreator, é inodoro e não contém microrganismos prejudiciais. Além disso, no solo, promove a proliferação de bactérias fixadoras de nitrogênio (Cechin, 2021).

Portanto é importante entender as características microbiológicas do bioinsumo produzido a partir da biodigestão, um produto biológico e orgânico, o que por sua vez contém uma microbiota bastante vasta, podendo conter microrganismo patogênicos (Machado, 2022), incluindo *Salmonella* em substrato de dejetos de suínos (Albuquerque 2012).

O microbioma em biorreatores anaeróbios desempenha um papel essencial na decomposição de matéria orgânica e na produção de biogás, especialmente em processos de digestão anaeróbica. Esses sistemas microbianos são compostos por consórcios complexos de bactérias e arqueias que trabalham de maneira sintrófica para converter compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono (De Vrieze et al., 2018). A diversidade microbiana é um fator crítico para a estabilidade e a eficiência do processo, uma vez que diferentes microrganismos atuam em etapas específicas da degradação de compostos complexos, como carboidratos,

proteínas e lipídios, transformando-os em intermediários como ácidos graxos voláteis, hidrogênio e acetato (Li *et al.*, 2020). Estudos indicam que a composição e a dinâmica do microbioma em biorreatores variam conforme as condições operacionais e o tipo de substrato utilizado, o que reforça a importância de entender a comunidade microbiana para otimizar a produção de biogás e a estabilidade do sistema (Campanaro *et al.*, 2016).

Desta maneira, a avaliação genômica do digestato de biorreatores que utilizando carcaça desidratada e dejetos suínos, tem como objetivo nos revelar se há presença de microrganismo patogênicos que podem estar presentes nesse subproduto, já que ele é de grande importância para o uso em terras agrícolas, fazendo com que exista um ciclo de sustentabilidade, pois poderá ser reutilizado como biofertilizante, após a biodigestão.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUÇÃO DE BIOMETANO

O Processo de produção de biometano acontece em um biorreator, isto é um equipamento que simula um ecossistema no qual microrganismo transformam matéria orgânica em metano, gás carbônico, água, ácido sulfúrico e amônia (Dufraier; Soares, 2017). Com parâmetros mantendo a temperatura, pH e níveis de oxigênio controlados, é um ambiente homogêneo pela agitação constante (Mcbride, 2011). Cada biorreator, ou biorreator, é acompanhado por um gasômetro, que é um reservatório que estoca o biogás gerado pela câmara ou reservatório de biodigestão (Souza *et al.*, 2014).

O produto gerado com potencial energético é o metano, a produção de metano pode variar de acordo com a biomassa disponível como substrato podendo ser de 40% a 70% do volume total de biogás (Salomon, 2007).

A operação da produção de biogás podendo ocorrer em três tipos de fermentação: A fermentação descontínua é uma forma simples de fermentação, inicia com o carregamento do reator com meio de cultura e microrganismo, após a esterilização, se necessária. Durante o processo, não há adição contínua de meio de cultura, apenas de substâncias auxiliares como antiespumantes e ajustadores de pH. Ao fim de um período adequado, o biorreator é esvaziado com os produtos desejados (Deganuttl, 2002).

No processo contínuo, a alimentação de substrato para o reator é feita de maneira constante e a uma taxa ininterrupta. Simultaneamente, ocorre a retirada contínua de produtos e caldo fermentado, resultando na manutenção de um volume constante no biorreator. Uma característica destacada desse tipo de reator é a possibilidade de operar em estado estacionário, onde as variáveis do processo, como a concentração de células e de substrato, são mantidas constantes. No entanto, atingir esse estado estável pode ser desafiador devido a outros fatores do processo (Schmidell *et al.*, 2001).

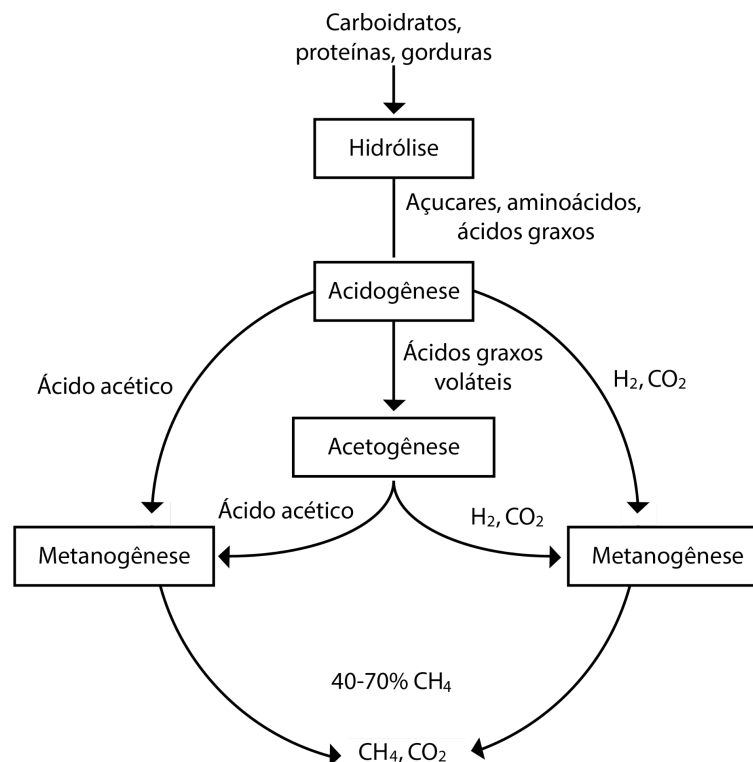
O terceiro tipo de fermentação é a semicontínua que é operada em três etapas principais: uma fermentação em batelada, a descarga de parte do mosto fermentado e a adição de meio de fermentação com o mesmo volume para iniciar uma segunda batelada. Dessa forma, o meio fermentado da

primeira batelada é usado como inóculo para a segunda fermentação, podendo até ser centrifugado para separar os microrganismos antes da terceira etapa (Schmidell *et al.*, 2001).

## 2.2 BIODIGESTÃO

A produção de biometano ocorre por meio da digestão anaeróbia, é um processo biológico que acontece na ausência de oxigênio. Um conjunto de microrganismos se une para converter o substrato que contém carbono orgânico em metano e dióxido de carbono. Esse processo acontece em quatro etapas sinérgicas: hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, como podemos ver na figura 1 (De Carvalho, 2023). As etapas estão interligadas de maneira intrincada, assim, o processo de produção de biogás ocorre com eficácia em duas etapas, é importante que o nível de degradação ocorra de maneira uniforme entre as etapas (Deublein, Steinhauser, 2011).

**Figura 1** - Diagrama do Processo de degradação de material orgânico em digestão anaeróbica  
Fonte: (Li; Park; Zhu, 2011)



A hidrólise é a etapa que decompõem substâncias com peso molecular mais elevado, como polissacarídeos, lipídios e proteínas, em compostos orgânicos mais simples chamadas de monômeros, que são mais solúveis, o processo acontece pela ação de enzimas extracelulares que são excretadas por bactérias hidrolíticas. Esse é um processo de degradação que depende das características do substrato, assim como a velocidade do processo varia de acordo com a complexidade do material orgânico, materiais compostos de lignina, por exemplo, são hidrolisados por mais tempo e por muitas vezes de maneira incompleta (C Bley Junior, 2009).

O material resultante da hidrólise, os monômeros, são utilizados como fonte de energia por bactérias anaeróbicas e facultativas. Na fase acidogênica os monômeros são convertidos em ácidos orgânicos de cadeia curta com moléculas de 1 a 5 carbonos como, por exemplo: ácidos acético, butírico e propiônico, além de álcoois, óxidos de nitrogênio, sulfeto de hidrogênio, hidrogênio e dióxido de carbono. Carboidratos como a glicose são degradados em piruvato na acidogênese, o piruvato por ação de Lactobacillales é convertido em ácido láctico e em etanol por leveduras (Amaral; Steinmetz; Kunz, 2019).

A fase acetogênica os produtos gerados na fase acidogênica são consumidos como substratos para os microrganismos e são realizadas oxidações anaeróbicas (Aslanzadeh, 2014).

Produtos que ainda não foi convertidos em metano diretamente pelas bactérias metanogênicas são alterados em substratos metanogênicos, os ácidos graxos voláteis e álcoois são oxidados em compostos metanogênicos como acetato, hidrogênio e dióxido de carbono (Teodorita Al Seadi *et al.*, 2008).

Já a etapa denominada metanogênese, o carbono utilizado como substrato transformado em dióxido de carbono e metano, ocorre por meio de arqueias metanogênicas (Lyu *et al.*, 2018).

As arqueias metanogênicas se subdividem em duas categorias principais de acordo com suas vias metabólicas: acetoclásticas e hidrogenotróficas. As arqueias metanogênicas acetoclásticas, exemplificadas por organismos como o *Methanosarcina*, convertem acetato em metano, enquanto as arqueias metanogênicas hidrogenotróficas, representadas por *Methanobacterium* e *Methanospirillum*, convertem hidrogênio e dióxido de

carbono em metano (Amaral; Steinmetz; Kunz, 2019).

## 2.3 DIGESTATO

O digestato é o produto residual do processo de produção de biogás, após a matéria orgânica ser degradada no biorreator pela biodigestão de microrganismo. Em seu estado líquido a biomassa fermentada será composta de nutrientes e, uma vez utilizada no solo, poderá desempenhar o papel de biofertilizante trazendo benefícios de características físicas, químicas e biológicas do solo (Dotto; Wolff, 2012).

O biofertilizante foi gerado através da produção de biogás em um biorreator. Desta forma, este resíduo pode ser considerado um adubo orgânico de baixo custo, que tem propriedades que melhoram o desempenho do solo no plantio, além de não possuir agentes causadores de doenças e pragas, o biofertilizante tem valores substanciais de nutrientes que são ricos para o solo como nitrogênio, fósforo e potássio (Oliveira, 2014).

Dentre os elementos presentes no biofertilizante, o nitrogênio é um componente fundamental para as plantas, sendo o mineral que necessitam em maiores quantidades, pois desempenha um papel essencial na formação de diversos elementos celulares vegetais, como a clorofila, aminoácidos e ácidos nucleicos (Taiz *et al.*, 2017). O fósforo é um elemento essencial em compostos vitais nas células vegetais, sendo também um constituinte dos nucleotídeos envolvidos no metabolismo energético das plantas, assim como no DNA e no RNA (Casbis, 2016). O potássio é presente em abundância em rochas e solos, ocorrendo na estrutura de minerais (Raij, 1991), sendo encontrado no solo como cátion trocável e na solução, sob a forma de íon  $K^+$ . Esse nutriente tem um papel significativo na regulação do potencial osmótico das células vegetais, além de ativar numerosas enzimas relacionadas à respiração e à fotossíntese (Taiz *et al.*, 2017).

### 2.3.1 QUALIDADE DO DIGESTATO

O digestato poderá apresentar variações pois é influenciada pelo substrato, por sua fonte de inóculo, pelo sistema de digestão anaeróbia, pelas

condições operacionais empregadas, e pela configuração dos reatores (Simon, 2020).

Outro fator que impacta a composição dos nutrientes do digestato, além das diferenças na composição química e diversidade em relação aos substratos, são as diferentes proporções das misturas que serão utilizadas na alimentação do digestor. As plantas de produção de biogás, por esse contexto, precisam necessariamente utilizar análises específicas para poder determinar as condições e quantidades de nutrientes disponíveis para o uso como fertilizante agrícola. (Amaral; Steinmetz; Kunz, 2019).

Deve-se atentar as regulamentações que são estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que informam as especificidades de concentrações máximas permitidas para caracterizar elementos nos fertilizantes e junto ao Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) quanto ao uso desse bioinsumo como biofertilizante (FEAM, 2015). O Anexo V da Instrução Normativa (IN) nº 27/2006 da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA) do MAPA estabelece os limites máximos de contaminantes, como sementes, metais pesados e agentes patogênicos, permitidos em condicionadores do solo e fertilizantes orgânicos. Estes critérios devem ser levados em consideração ao utilizar o material digerido na agricultura (Feam, 2015).

As leis e instruções brasileiras, definem valores limites que um fertilizante pode apresentar de cada nutriente, com o intuito de evitar ou diminuir os impactos negativos ao solo (Coelho, 2007). O biofertilizante é estipulado como:

O produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, livre de agrotóxicos, com capacidade de influenciar, de forma direta ou indireta, no crescimento de plantas cultivadas, aumentando sua produtividade, independentemente de seu valor hormonal ou estimulante (Simon, 2020).

de acordo com o decreto nº 4.954, datado de 14 de janeiro de 2004

O digestato para poder ser considerado apropriado para o uso como biofertilizante deve ser obtido de matéria-prima de qualidade controlada, pois assim estará limpo de impurezas físicas, químicas e de poluentes, além de estar livre de patógenos (Al Seadi *et al.*, 2013).

## 2.4 MICROBIOMA DOS BIORREADORES

O microbioma dos biorreatores desempenha um papel crucial na degradação de resíduos orgânicos e na produção de biogás, especialmente em processos anaeróbicos. Compostos por consórcios complexos de bactérias e arqueias, esses sistemas microbianos atuam de forma sinérgica para converter matéria orgânica em metano e dióxido de carbono. Essa diversidade microbiana é essencial para a eficiência e estabilidade do processo, pois diferentes microrganismos são responsáveis pela degradação de compostos específicos, como carboidratos, proteínas e lipídios, produzindo intermediários importantes como ácidos graxos voláteis e hidrogênio (Jéglot *et al.*, 2021)

A estrutura e função do microbioma variam conforme as condições do biorreator, como o tempo de retenção e o tipo de substrato. Essas variáveis determinam a composição das comunidades microbianas e influenciam diretamente a produtividade do sistema. Em biorreatores de remoção de nutrientes, por exemplo, microrganismos como *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são comuns e possuem enzimas capazes de degradar materiais lignocelulósicos (Ransom-Jones *et al.*, 2017), adaptando-se às exigências do processo de digestão anaeróbica e de tecnologias avançadas, como o sequenciamento de alta resolução, é possível monitorar essas comunidades de maneira mais detalhada, o que auxilia no ajuste e otimização dos processos. Esse monitoramento permite a bioestimulação e potencializa o uso de digestatos de biorreatores como biofertilizantes eficientes, beneficiando práticas agrícolas sustentáveis e ampliando o uso dos biorreatores na gestão de resíduos

## 2.5 MAPEAMENTO GENÉTICO DO DIGESTATO

O sequenciamento metagenômico Illumina é uma ferramenta poderosa para identificar e caracterizar a diversidade microbiana presente em amostras de biorreatores. Essa técnica permite mapear as comunidades microbianas de forma detalhada, incluindo a identificação dos genes e das funções desempenhadas por diferentes microrganismos. Essa informação é essencial para avaliar o potencial biofertilizante do digestato, pois possibilita a

identificação de espécies promotoras de crescimento, fixadoras de nitrogênio e solubilizadoras de nutrientes, características benéficas para a saúde do solo e o desenvolvimento sustentável de culturas (Loman; Pallen, 2015).

A metodologia envolve a extração, preparação e sequenciamento do DNA presente nas amostras, seguido de uma análise detalhada que permite atribuir funções específicas aos microrganismos detectados. O sequenciamento de alta precisão da Illumina oferece uma visão abrangente das interações microbianas e da estrutura funcional das comunidades, possibilitando o uso eficaz de resíduos como biofertilizantes em práticas agrícolas sustentáveis (Illumina, 2019) .

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a comunidade microbiana associada a biodigestatos associados a processos de digestão.

#### **3.1 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Coletar amostras de digestatos após processo de biodigestão com carcaça suína e efluente suíno.
- Realizar análises físico-química nas amostras coletadas
- Realizar análise da comunidade microbiana por ferramentas genômicas, em uma empresa terceirizada.

### **4 METODOLOGIA**

#### **4.1 COLETA DAS AMOSTRAS**

O biorreator de lagoa coberta (BLC) é um tanque de grande capacidade, coberto para evitar a liberação de gases no ambiente e capturar o biogás gerado. O biorreator anaeróbico de lagoa coberta é usado principalmente em resíduos líquidos com alta carga orgânica, como efluentes suínos. A

cobertura mantém o ambiente anaeróbico e permite a captura do biogás, sendo uma opção de baixo custo e adequada para instalações em áreas amplas (Pereira *et al.*, 2023).

A amostra coletada desse reator foi digestato produzido com adição de carcaça desidratada (efluente suíno e carcaça) operado de forma semi contínua em escala laboratorial com capacidade de 10 L (figura 2), na data de 30 de agosto de 2023, sendo o tempo 0 (o primeiro momento da saída do digestato), a amostra quando coletada estava em estabilização, onde ficou um tempo sem alimentação, processo final da operação. Sua operação ocorreu na temperatura de 37 °C, com agitação com bomba peristáltica por 10 minutos a cada 1h.

**Figura 2** - Biorreator de Lagoa Coberta (BLC). Fonte: Cibiogás, Itaipu Parquetec 2024 - Foz do Iguaçu, PR



Um CSTR (*Continuous Stirred-Tank Reactor*) é um tipo de biorreator no qual o substrato e os microrganismos são continuamente misturados, mantendo a homogeneidade da amostra e otimizando o contato entre os microrganismos e os nutrientes. Em sistemas anaeróbicos, o CSTR é eficiente para processos de digestão onde a matéria orgânica é convertida em biogás, com taxas de remoção de sólidos relativamente constantes, especialmente

adequado para materiais homogêneos (Yang *et al.*, 2019).

A segunda amostra foi coletada na data de 30 de agosto de 2023. Digestato produzido na Central de Bioenergia de Toledo - PR com alimentação de dejetos de suínos fase terminação (efluente suíno), biorreator em escala plena com capacidade de 3000m<sup>3</sup> (figura 3) modelo CSTR também em tempo 0 (é o primeiro momento da saída do digestato). Sua operação estava iniciando sem aquecimento com uma agitação.

**Figura 3** -Central de Bioenergia de Toledo (CSTR). Fonte: CibioGás, 2024 - Toledo, PR



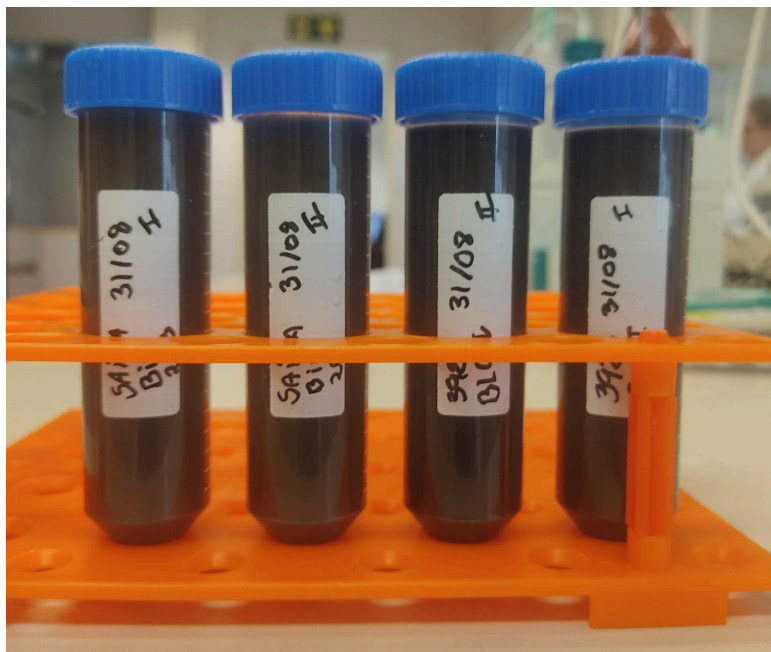
A primeira amostra foi coletada em um recipiente de 2 L devidamente higienizado, sendo lavado com água e Extran neutro e enxaguando com água deionizada, após a coleta foi reservado em uma geladeira em uma temperatura de 2 °C.

A segunda amostra foi coletada em um recipiente de 2 L devidamente higienizado, sendo lavado com água e Extran neutro e enxaguando com água deionizada, foi reservado em uma caixa térmica com gelo em gel até a chegada ao laboratório da CibioGás em Foz do Iguaçu, a amostra chegou em uma temperatura de 2 °C.

foi reservadas 100 mL de cada em 2 tubos Falcon esterilizados como mostra a figura 4, e foi congeladas em um freezer a -15 °C, até o dia de serem

enviadas para o laboratório de sequenciamento da empresa LAGBIO - Análise Genômicas e Biotecnologia.

**Figura 4** - Amostras dos digestatos para sequenciamento. Fonte: O autor, 2023



#### 4.2 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ENSAIO DE SÓLIDOS

No laboratório do Centro Internacional de Energias Renováveis (CIBIOGÁS), foi realizado o experimento de teor de sólidos para avaliar o comportamento dos substratos orgânicos quando submetidos à biodigestão anaeróbia, bem como a capacidade de produzir biogás em relação a sólidos totais (ST), voláteis (SV) e fixos (SF). As amostras passaram por um processo de calcinação. Após medir os sólidos totais (ST), a amostra é submetida à calcinação a uma temperatura de 550 °C, resultando na oxidação do material, que é transformado em CO<sub>2</sub> e evapora. Os sólidos fixos são a parte do material que não sofre volatilização. A diferença entre os sólidos fixos e os sólidos totais é usada para determinar o valor dos sólidos voláteis (Botelho, 1974).

#### 4.3 ACESSO A COMUNIDADE MICROBIANA DOS DIGESTATO

As amostras foram descongeladas e, em seguida, realizou-se a

extração de DNA seguindo o protocolo rápido do Kit DNeasy® PowerSoil® Pro, que foi fornecido pela empresa LAGBIO. Em seguida, o kit Nextera XT (V2) foi aplicado para montar as bibliotecas metagenômicas, com sequenciamento no equipamento Illumina MiSeq. A reação de PCR foi conduzida sob as seguintes condições: 95 °C por 3 minutos, seguidos por 25 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos, com uma extensão final a 72 °C por 5 minutos, conforme recomendado na nota técnica 15044223 Rev. B de (Illumina, 2017). O *pipeline* utilizado foi baseado em Breitwieser e Salzberg (2019), com filtragem das sequências de baixa qualidade realizada pelo software Sickle (Joshi e Fass, 2011), removendo-se leituras menores que 50 pb e com phred score inferior a 20. A análise taxonômica foi executada com o algoritmo Kraken (Wood e Salzberg, 2014). As bibliotecas foram submetidas a sequenciamento usando o sistema MiSeq Sequencing System da juntamente com o kit V2, que permite 300 ciclos (Illumina, 2012). O sequenciamento foi realizado em *single end*. Cada fragmento de DNA é lido de apenas uma extremidade até o final, resultando em uma única sequência por fragmento.

As sequências passaram por uma análise realizada pela LAGBIO e foi submetida a um pipeline exclusivo. Após a etapa de processamento, procedemos à filtragem de clusters para agrupar sequências semelhantes e identificar os representantes principais de cada grupo. Isso nos permitiu simplificar a complexidade dos dados, tornando a análise mais eficiente (Breitwieser; Lu; Salzberg, 2017). Em seguida, investigamos a composição taxonômica da microbiota, determinando a abundância dos gêneros e espécies presentes na amostra. Utilizamos ferramentas de análise de bioinformática avançadas para atribuir sequências a categorias taxonômicas específicas, o que nos permitiu obter informações detalhadas sobre os microrganismos presentes e sua distribuição na amostra (Parks *et al.*, 2014).

Para as análises de bioinformática, foram utilizadas duas ferramentas principais: RStudio e OmicsBox (“Bioinformatics software”, 2022) (“Posit”, 2022). No RStudio, foi gerados gráficos de abundância relativa, que permitiram visualizar a distribuição dos microrganismos presentes nas amostras de maneira clara e comparativa. Já no OmicsBox, foi realizadas análises mais detalhadas, incluindo gráficos de taxonomia, curvas de rarefação, além da criação de tabelas com os *OTUs* lidos e classificados e a porcentagem das classificações

encontradas nas amostras (Wood; Lu; Langmead, 2019).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Na amostra coletada no BLC composta de uma co-digestão (efluente suíno e carcaça desidratada) observa-se que 66,76% da do seu material é orgânico, como podemos ver na tabela 1, isto significa que a maior parte da amostra é então biodegradável e que após o processo de biodigestão no reator, ainda existe material que pode ser decomposto. Na amostra do CSTR vemos o caso onde em sua maior parte, 57,37% é sólidos fixos, isso indica que há uma quantidade maior de material inorgânico presente na amostra, como minerais, metais e outros compostos não voláteis. Os sólidos fixos não são biodegradáveis (Amaral; Steinmetz; Kunz, 2019).

**Tabela 1** - Análise dos físico-químicos dos BLC e CSTR. Fonte: O autor, 2023

Reator	Alimentação	Média ST (%)	Média SF (%)	Média SV (%)	ST (g/kg)	SV* base seca (g/kg)	SF* base seca (g/kg)	pH
BLC	Efluente suíno + carcaça desidratada	2,04	33,24	66,76	20,4	667,6	332,4	8,2
CSTR	Efluente suíno	0,76	57,37	42,63	7,6	426,3	573,7	7,6

### 5.2 DIVERSIDADE TAXONÔMICA NOS BIORREATORES

Os resultados obtidos a partir do sequenciamento metagenômico das amostras BLC e CSTR revelam diferenças na quantidade de *OTUs* (*Operational Taxomic Unit*) gerados e classificados, o que reflete diretamente a complexidade e a composição dos materiais amostrados. O total de *OTUs* lidos foi maior na amostra CSTR (275.792) em comparação à amostra BLC (163.944) que podemos ver na tabela 2, o que pode ser atribuído a fatores como a composição

química das amostras e a eficiência da extração de DNA (Weber; Deforce; Apprill, 2017). Além disso, as diferenças no número de *OTUs* lidos e classificados entre as amostras podem ser relacionadas à eficiência dos processos de digestão anaeróbia nos respectivos biorreatores, bem como ao estágio de estabilização das amostras. O BLC esteve em estágio de estabilização por um período antes da retirada da amostra. O entendimento da composição microbiana ao longo desse processo é fundamental para otimizar a produção de biogás e, posteriormente, a qualidade do biofertilizante resultante (Kumar *et al.*, 2024).

**Tabela 2** - Taxonomia do BLC e CSRT. Fonte: O autor, 2023

Reator	Alimentação	<i>OTUs</i>	Comprimento médio	<i>OTUs</i> classificados	<i>OTUs</i> classificados (%)
BLC	Efluente suíno + carcaça desidratada	163944	100.0	32207	19.65%
CSTR	Efluente suíno	275792	100.0	57305	20.78%

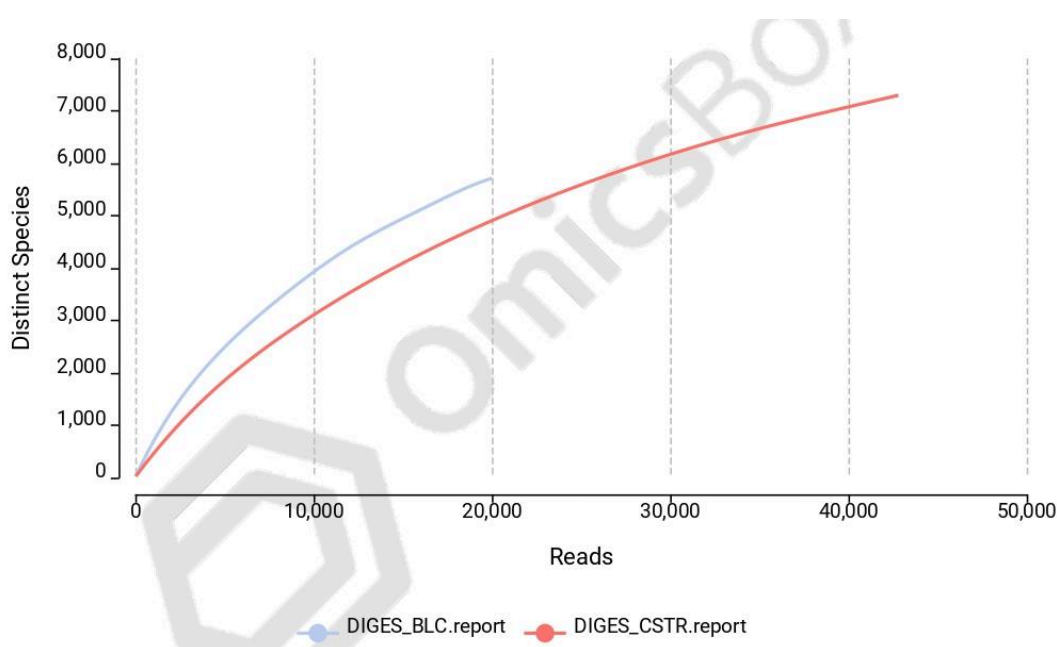
Durante a filtragem, sequências de baixa qualidade ou muito curtas podem ser descartadas, resultando em um conjunto final com menor conteúdo informativo. Esse processo pode eliminar trechos relevantes que ajudaram na classificação, especialmente se o DNA for fragmentado ou degradado, dificultando o mapeamento para referências e reduzindo a quantidade de *OTUs* que atendem aos critérios para identificação taxonômica ou funcional (Nurk *et al.*, 2017)

Uma outra interpretação que pode ter contribuído pela grande diferença de *OTUs* nas amostras é a diferença no tamanho dos reatores, já que um o BLC tem capacidade de 10 L e o CSTR tem uma capacidade maior que 1000 L, então a quantidade de biomassa que cada biorreator recebe de substrato e bem diferente o que pode ter levado essa diferença de *OTUs* gerados (SUNG; DAGUE, 1995).

A porcentagem dos *OTUs* classificados foi 19,65% e 20,78%, respectivamente para a amostra BLC e CSTR, no Gráfico 1 nos mostra que

ambas as amostras não atingiram uma saturação, indicando que ainda faltam grupos taxonômicos a serem recuperados nas duas amostras estudadas. Embora relativamente baixa, essa porcentagem é observada em estudos de metagenomas de ambientes complexos, como os resíduos de biorreatores (Brown *et al.*, 2017). A presença de material orgânico complexo, especialmente na amostra BLC (que inclui carcaça desidratada), pode ter contribuído para uma menor eficiência de classificação, já que esse tipo de substrato pode abrigar microrganismos menos estudados.

**Gráfico 1** - Curva de rarefação do BLC e CSTR. Fonte: O autor, 2024



Os índices de diversidade de *Shannon* e *Simpson* também fornecem informações importantes sobre a riqueza e diversidade microbiana das amostras avaliadas. O Índice de Shannon, que mede a diversidade, apresentou um valor maior para o BLC (7.6) em comparação ao CSTR (5.373). Esse resultado sugere que a mistura de carcaça de porco e efluente suíno no BLC apresenta maior diversidade microbiana (Kim *et al.*, 2017).

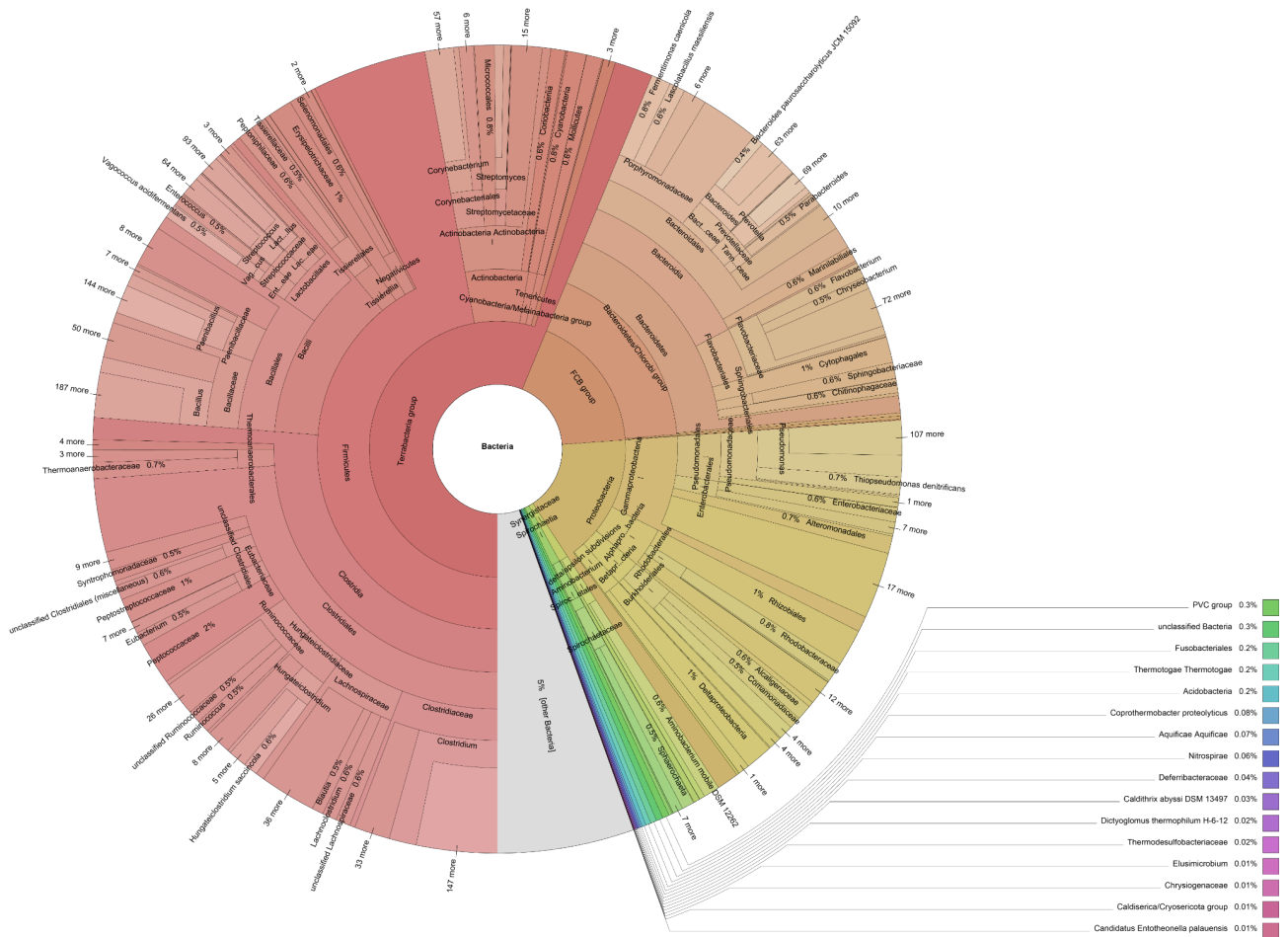
Por outro lado, o Índice de Simpson, que mede a dominância de espécies, reflete maior uniformidade na distribuição das espécies no BLC (0.9955) quando comparado ao CSTR (0.8326). Isso indica que, além de possuir maior diversidade, as espécies no BLC estão mais igualmente distribuídas, com menor dominância de grupos específicos (Kim *et al.*, 2017). Portanto, em

comparação, no reator CSTR algumas espécies tendem a dominar, resultando em uma menor uniformidade da comunidade microbiana. Esse padrão pode estar relacionado à composição menos complexa do substrato no CSTR, que consiste apenas em efluente suíno, o que favorece o crescimento de grupos microbianos específicos, mas limita a diversidade geral.

Nas figuras 5 e 6 podemos observar a grande diversidade do domínio das bactérias nas amostras do BLC e CSTR respectivamente. Visualmente podemos ver que elas são semelhantes e com alguns mais predominantes.

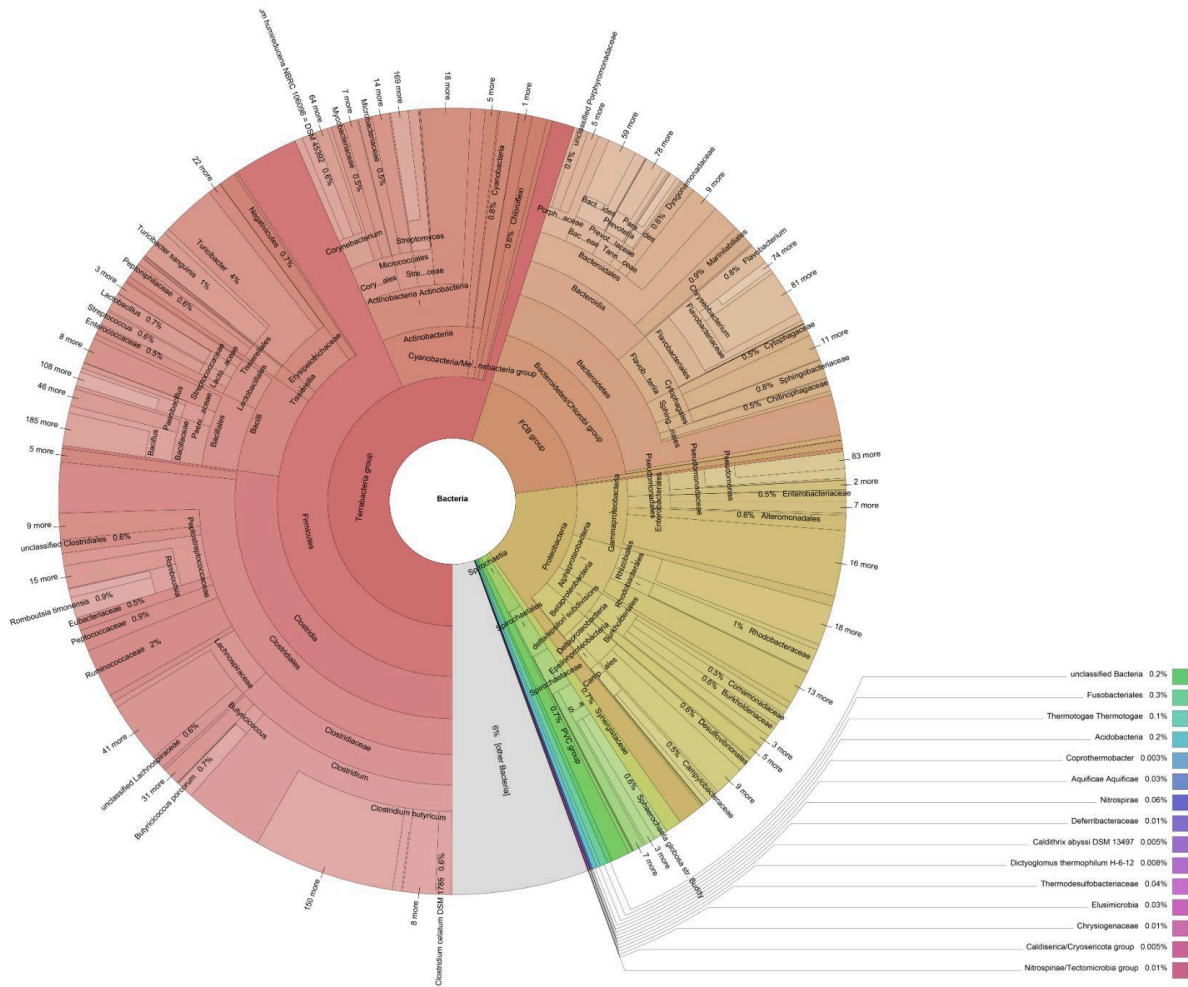
No BLC (figura 5) os filos mais abundantes em sequência de taxa de são os *Firmicutes* (44,62%), *Bacteroidetes* (16,4%), *Proteobacteria* (16,04%), e *Actinobacteria* (5,35%).

Figura 5 - Pie chart da taxonomia de bactérias no BLC. Fonte: O autor, 2024



No CSTR (figura 6) tivemos o mesmos filos predominantes porém com uma taxa menor entre eles, os *Firmicutes* (35,28%), *Bacteroidetes* (11,8%), *Proteobacteria* (11,74%), e *Actinobacteria* (5,78%).

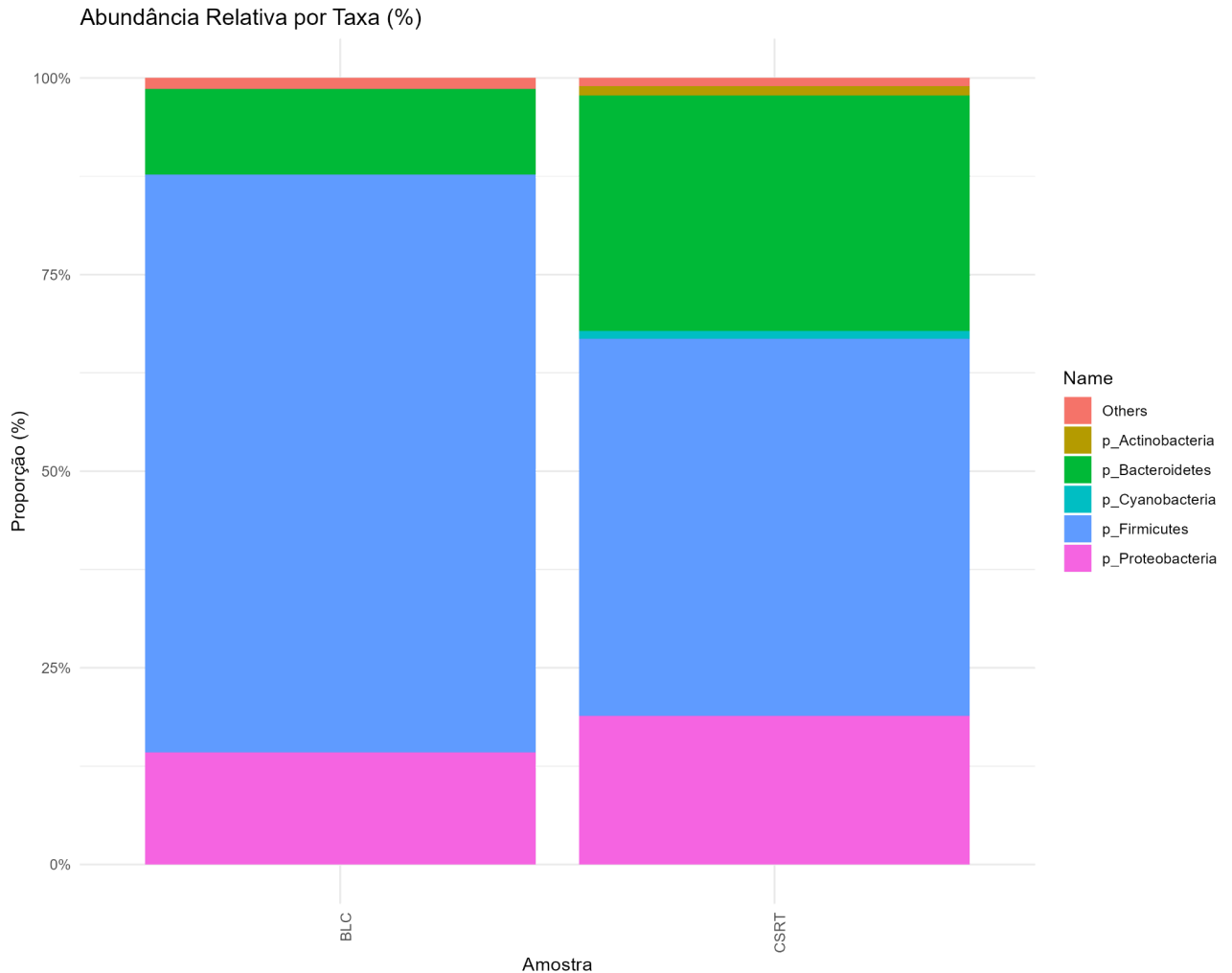
**Figura 6-** Pie chart da taxonomia de bactérias no CSRT. Fonte: O autor, 2024



Dentre os filos revelados (figura 7), na análise no BLC os mais abundantes são os Firmicutes (73,46%), Proteobacteria (14,25%), bacteroides (10,87%), já na amostra do CSTR os mais abundantes identificados são Firmicutes (47,91%), bacteroides (29,95%) Proteobacteria (18,91%), dentre outros acima de 1% temos também Actinobacteria (1,20%) e Cyanobacteria (1,01%). Firmicutes e Bacteroidetes são frequentemente envolvidos na degradação de material orgânico em ambientes anaeróbicos, e são constantemente revelados em metagenomas de

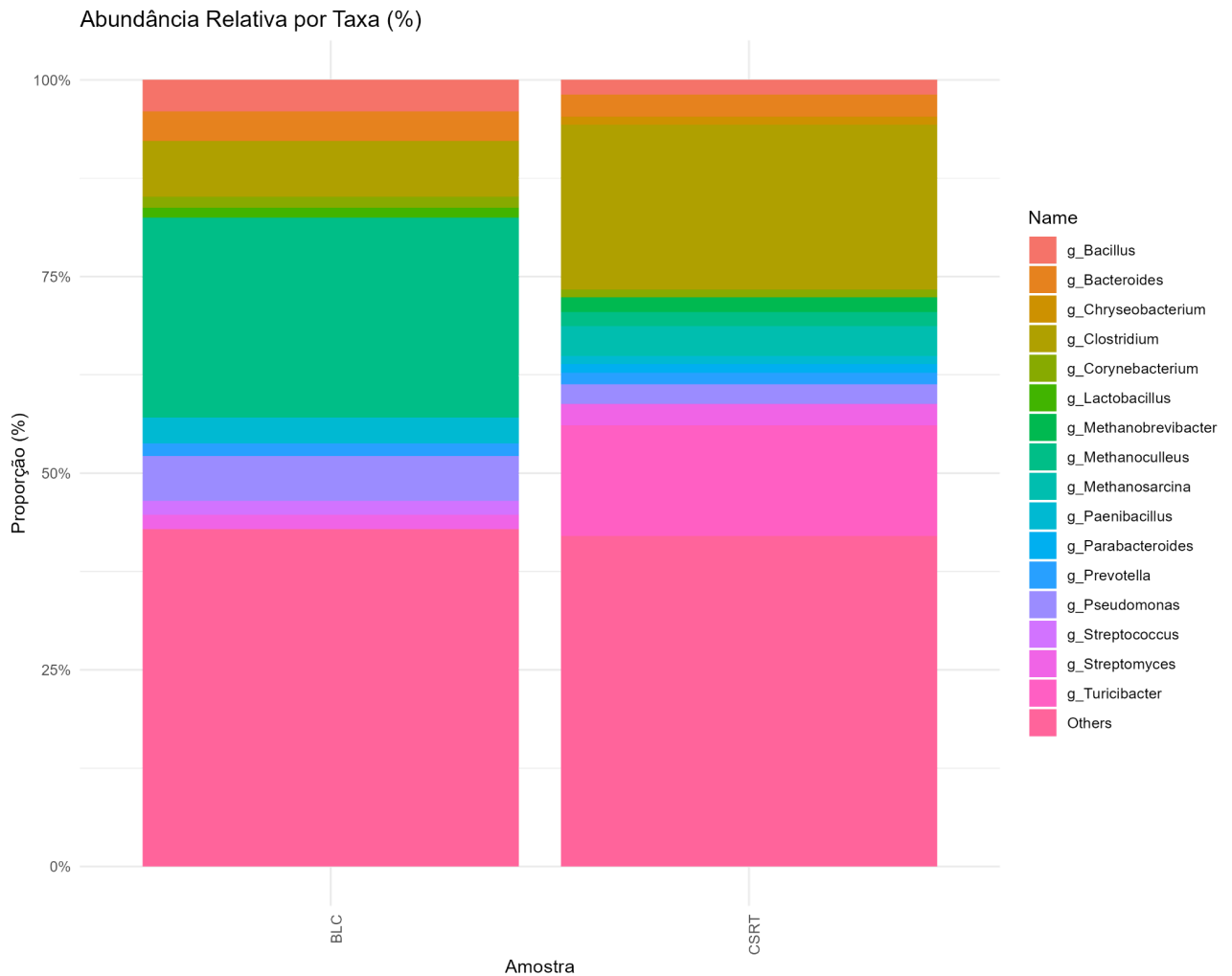
efluentes suínos (Duda *et al.*, 2015). Estudos sobre a decomposição de carcaça suína revelaram que os Firmicutes são predominantes, indicando sua adaptação a ambientes ricos em nutrientes fornecidos pela carcaça. Essa predominância sugere que esses microrganismos desempenham um papel crucial na decomposição de compostos orgânicos complexos nesses ambientes (Miguel *et al.*, 2023).

**Figura 7** - Abundância relativa taxonômica dos filos do BLC e CSTR Fonte: O autor, 2024



Foi identificados 520 gêneros entre as duas amostras, *Methanoculleus* (25,38%) foi o mais abundante na amostra do BLC, seguido do *Clostridium* (7,08%) e *Pseudomonas* (5,65%), os outros gêneros identificados ficaram entre 1% a 4% (Figura 8). Para a amostra do CSTR sua maior abundância foi o gênero *Clostridium* (20,90%), seguido por *Turicibacter* (14,13%) e *Methanosarcina* (3,78%), os outros gêneros identificados ficaram entre 1% a 3% (Figura 8), os gêneros abaixo de 1% foi unidos à "Others"

**Figura 8** - Abundância relativa taxonômica dos gêneros das amostras do BLC e CSTR Fonte: O autor, 2024



O gênero de maior importância para a análise dessas amostras é o *Clostridium*, que aparece nas duas amostras. O gênero *Clostridium* pertence ao filo Firmicutes e compreende um grupo diverso de bactérias gram-positivas, formadoras de esporos, com morfologia bacilar. Sua origem evolutiva está relacionada a ambientes anaeróbicos e ricos em matéria orgânica, onde desempenham funções importantes na decomposição e fermentação de compostos orgânicos complexos (Chen *et al.*, 2016). As espécies de *Clostridium* são encontradas principalmente em ambientes anaeróbicos, como solo e sedimentos, onde a matéria orgânica é abundante (Parija, 2023). Suas adaptações evolutivas permitem que eles decomponham com eficiência materiais orgânicos complexos, facilitando a ciclagem de nutrientes nos

ecossistemas (Jensen *et al.*, 2024).

Por mais que no BLC, o filo Firmicutes esteja em maior abundância (BLC - 73,46%, CSTR - 47,91%), quando analisamos por gênero vemos que o *Clostridium* tem uma taxa bem menor comparado ao CSTR (Figura 8). Podemos associar ao um pH mais alcalino do BLC que pode afetar negativamente a abundância de *Clostridium* em biorreatores anaeróbios, pois a maioria das espécies desse gênero prefere condições levemente ácidas a neutras, com um pH ideal geralmente entre 7,0 a 7,4 (Avaes, 1973.). Quando o pH se torna mais elevado, como podemos ver na tabela 2 o BLC estava com um pH de 8,2 assim a atividade metabólica e a reprodução dessas bactérias tendem a ser inibidas (Paulo *et al.*, 2020). O pH do BLC se tornou mais alcalino pois o digestato ficou em estabilização dentro do BLC, esse tempo é para recuperação de nutrientes do digestato que tem como objetivo extrair e concentrar os nutrientes presentes no efluente resultante da biodigestão anaeróbica. Esse digestato é rico em elementos essenciais para o crescimento das plantas, como nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) (Amaral; Steinmetz; Kunz, 2019).

Além de seu papel ecológico, é importante destacar que algumas espécies de *Clostridium* têm relevância industrial e médica (Pantaléon *et al.*, 2014). Enquanto algumas são utilizadas na produção de solventes, como o butanol, outras, como *Clostridium botulinum* e *Clostridium difficile*, são conhecidas por sua patogenicidade (Carmo *et al.*, 2015). No contexto das amostras analisadas, no entanto, a presença dessas espécies patogênicas não foi observada, sugerindo que o papel predominante do gênero *Clostridium* está relacionado principalmente à sua capacidade de decomposição e fermentação, com potencial benéfico para o processo de produção de biogás e, posteriormente, para a qualidade do biofertilizante.

O gênero *Methanoculleus* também se mostrou com uma grande diferença entre as amostras, na amostra do BLC foi identificada 25,83% e no CSTR 1,77%, o qual pertence ao domínio Archaea e à ordem Methanomicrobiales, sendo composto por metanogênicos obrigatórios. Estes grupos, desempenham um papel crucial na última etapa do processo de digestão anaeróbica. Esses microrganismo são responsáveis pela produção de metano (CH<sub>4</sub>) a partir de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e hidrogênio (H<sub>2</sub>), ou de formiato, acetato e outros compostos, contribuindo significativamente para a

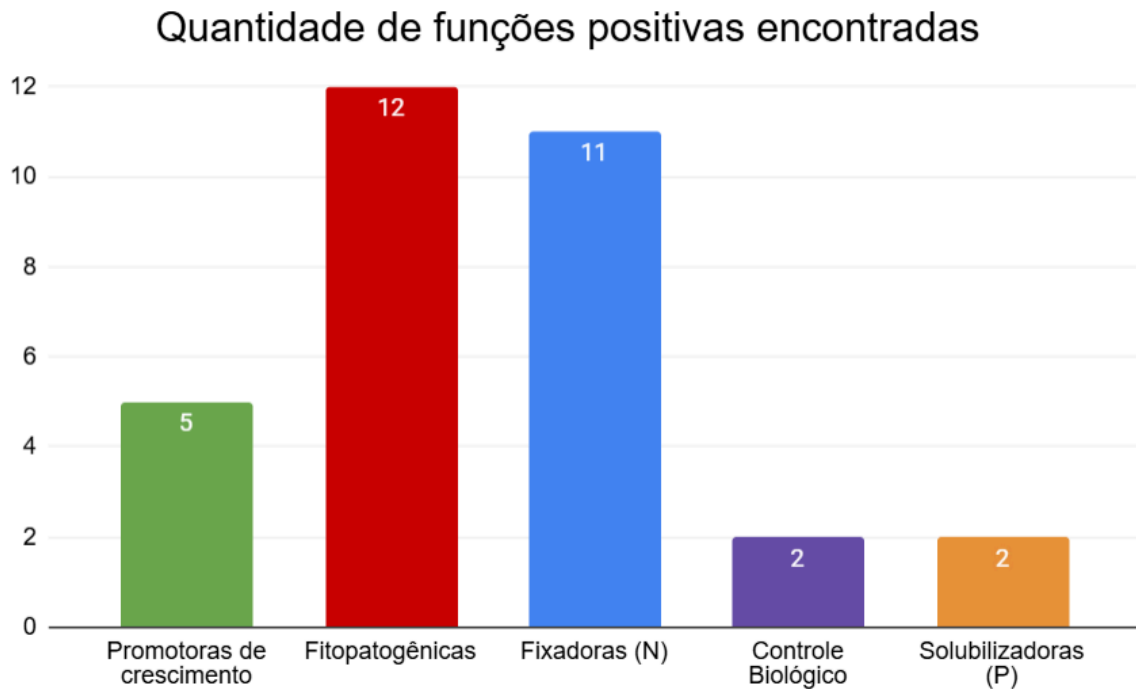
conversão final da matéria orgânica em biogás (Kern *et al.*, 2016).

A maior quantidade de material orgânico complexo presente na carcaça suína no reator BLC pode gerar uma diversidade maior de produtos de fermentação, como ácidos graxos voláteis e hidrogênio, que são utilizados por *Methanoculleus* como fonte de energia (Braga Nan *et al.*, 2020). Essa mistura de carcaça suína e efluente suíno pode oferecer uma maior disponibilidade de substratos fermentáveis e hidrogênio, essenciais para o crescimento dessa arqueia hidrogenotrófica, que utiliza H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> para produzir metano (Zhu *et al.*, 2020). Em contraste, o reator CSTR, com um substrato mais homogêneo, contendo apenas efluente suíno, apresenta uma menor produção de hidrogênio, limitando o crescimento e a abundância de *Methanoculleus*.

### 5.2.1 GÊNEROS BACTERIANOS BENÉFICOS PARA BIOFERTILIZANTES

Os resultados indicam que as amostras dos reatores BLC e CSTR apresentam quantidades equivalentes de gêneros bacterianos com funções benéficas como podemos ver no gráfico 2 para o uso do digestato como biofertilizante, o que difere é a quantidade de DNA encontrado de cada um dos gêneros. A presença de 5 gêneros promotores de crescimento sugere um potencial melhor para estimular o desenvolvimento das plantas. No entanto, o alto número de fitopatogênicas (12 gêneros) deve ser considerado, embora a coexistência com gêneros benéficos possa ajudar a mitigar seus efeitos adversos.

Além disso, a identificação de 11 gêneros fixadores de nitrogênio destaca a capacidade de melhorar a fertilidade do solo, enquanto a presença de 2 gêneros em controle biológico e solubilizadoras de fósforo indica um suporte para o manejo de pragas e a disponibilização de nutrientes. Assim, a similaridade nas quantidades de gêneros benéficos sugere que ambos os digestatos têm potencial para uso como biofertilizantes, promovendo o crescimento das plantas e contribuindo para a saúde do solo, essencial para a agricultura sustentável.

**Gráfico 2** - Quantidade de funções positivas encontradas nos biorreatores. Fonte: Autor, 2024

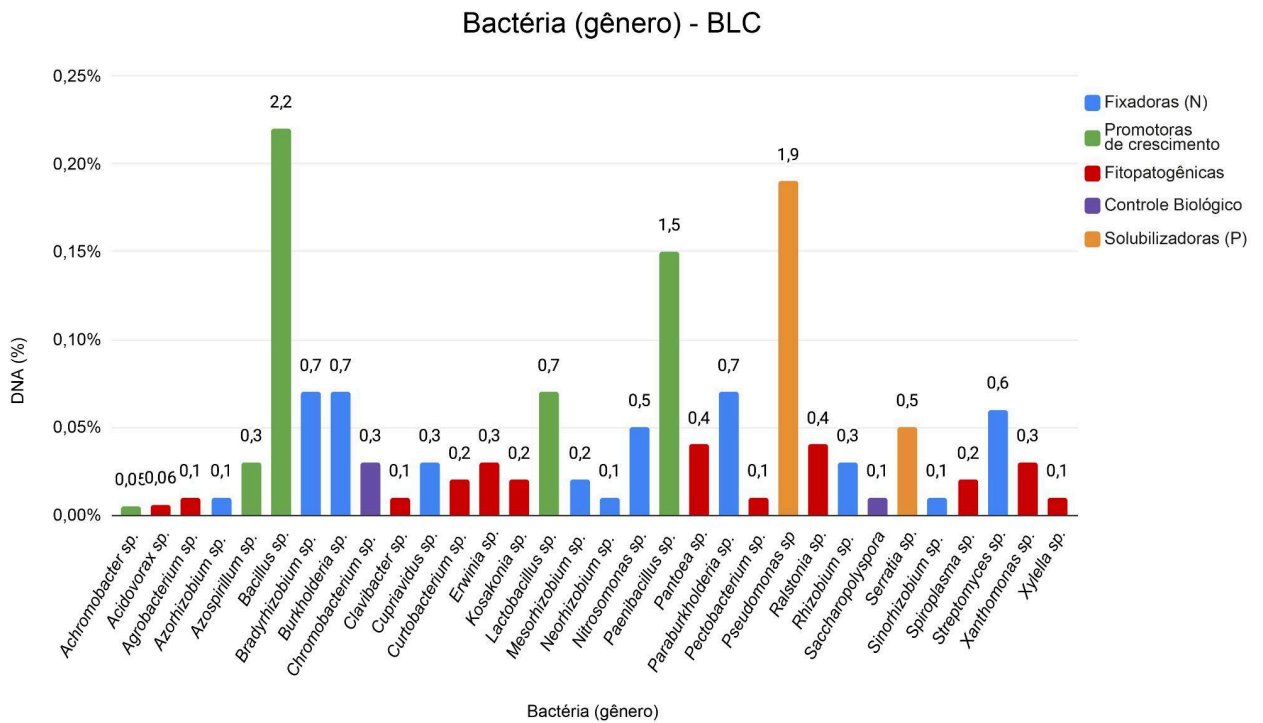
Na avaliação do digestato dos biorreatores realizada pelo serviço terceirizado, foi possível verificar a presença de espécies que potencializam esse resíduo como biofertilizante, os gráficos 3 e 4 apresentam as espécies benéficas encontradas nas amostras dos reatores BLC e CSTR, fornecendo importantes insights sobre o potencial biofertilizante desses resíduos, tanto para o crescimento das plantas quanto para a melhoria da fertilidade do solo. Os aspectos benéficos avaliados foi promotor de crescimento, fixação de nitrogênio, fitopatogenicidade, controle biológico e solubilização de fosfato.

Na amostra coletada do BLC e CSTR foi reveladas 32 espécies, no BLC as espécies que se encontraram mais abundantes foi *Bacillus* sp. (2,2%), *Lactobacillus* sp. (0,7%) e *Paenibacillus* sp. (1,5%) são espécies conhecidas por estimular o crescimento das plantas através da produção de fitohormônios e enzimas que ajudam na absorção de nutrientes. Também foi encontradas no CSTR mas em menores proporções em comparação com o BLC, *Bacillus* sp. (1,06%), *Lactobacillus* sp. (0,48%) e *Paenibacillus* sp. (0,48%). Isso sugere que, embora o CSTR tenha potencial como biofertilizante, a eficácia na promoção do crescimento vegetal pode ser ligeiramente inferior à do BLC. A presença dessas bactérias em porcentagens maiores no BLC sugere que essa amostra tem um

grande potencial para ser utilizada como biofertilizante promotor de crescimento vegetal (Soni; Keharia, 2021).

**Gráfico 3** - Gêneros encontrado no BLC com potenciais funções benéficas como biofertilizante

Fonte: Adaptado da Lagbio, 2023

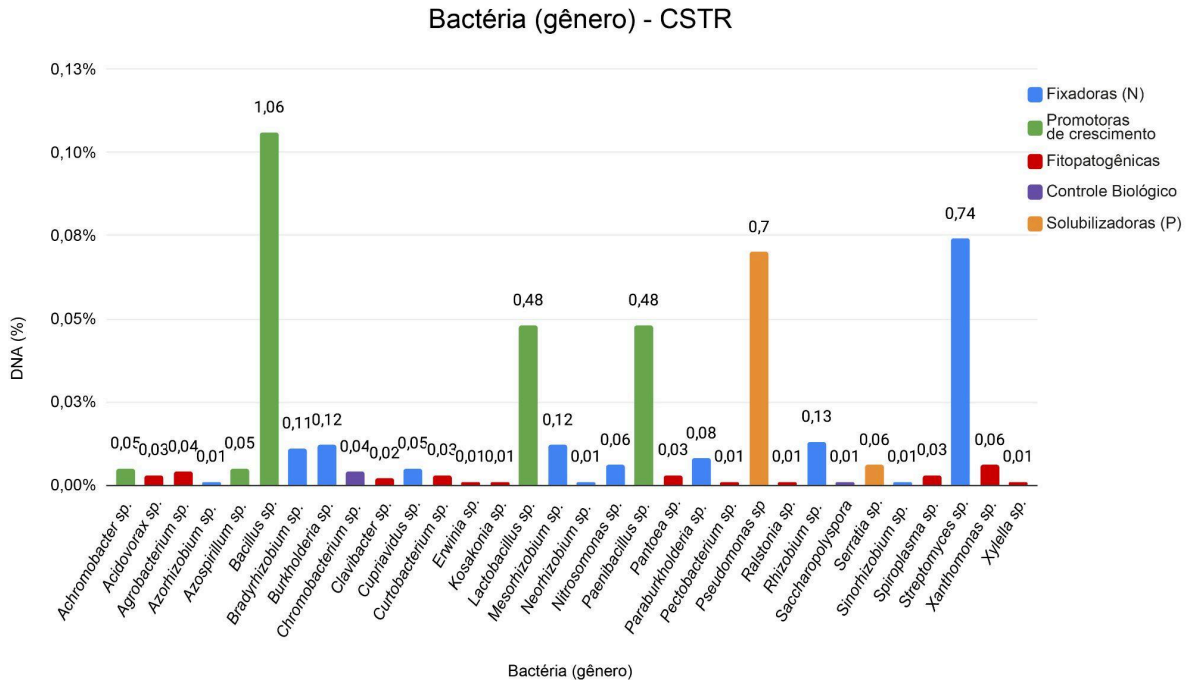


Os gêneros fixadores de nitrogênio em maior abundância no BLC foi *Bradyrhizobium* sp. (0,7%), *Burkholderia* sp. (0,7%) e *Paraburkholderia* sp. (0,6%) eles desempenham um papel essencial na fixação biológica do nitrogênio, convertendo o nitrogênio atmosférico em formas utilizáveis pelas plantas (Aasfar *et al.*, 2024). A presença dessas bactérias é um indicativo da capacidade do BLC em melhorar a fertilidade do solo ao aumentar a disponibilidade de nitrogênio, um nutriente essencial para o desenvolvimento das plantas.

No CSTR, a espécie *Streptomyces* sp. (0,74%) é quem desempenha o papel de fixadora de nitrogênio. Embora em menor quantidade comparado ao BLC, essa espécie ainda pode contribuir para a melhoria da fertilidade do solo (Yang *et al.*, 2019).

**Gráfico 4 - Gêneros encontrado no CSTR com potenciais funções benéficas como biofertilizante**

Fonte: Adaptado da Lagbio, 2023



*Pseudomonas* sp. e *Serratia* sp. são capazes de solubilizar o fosfato (Xia *et al.*, 2023), foi encontradas no BLC 1,9% e 0,5% enquanto no CSTR 0,7% e 0,06% respectivamente tornando-o disponível para as plantas. Como o fósforo é um nutriente limitante em muitos solos, a presença dessas espécies aumenta o valor biofertilizante da amostra BLC (Cortés-Albayay *et al.*, 2024).

A amostra BLC apresenta uma maior diversidade e quantidade de microrganismos benéficos, especialmente em relação aos promotores de crescimento e solubilizadores de fósforo. A presença mais acentuada de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp., que juntos somam mais de 4% da comunidade microbiana, sugere que o BLC possui maior potencial biofertilizante, principalmente para melhorar a absorção de nutrientes pelas plantas e promover um crescimento mais vigoroso.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados e discussões apresentadas neste trabalho, foi possível avaliar de maneira abrangente o potencial biofertilizante das amostras provenientes dos reatores BLC (carcaça suína + efluente suíno) e CSTR (efluente suíno). As análises físico-químicas, microbiológicas e a avaliação da diversidade de espécies indicam que ambos os digestatos possuem características relevantes, mas com diferenças que impactam sua aplicabilidade como biofertilizantes.

A partir dos resultados obtidos, foi possível avaliar o potencial biofertilizante das amostras provenientes dos reatores BLC (carcaça suína + efluente suíno) e CSTR (efluente suíno). As análises físico-químicas e microbiológicas mostraram que ambos os digestatos apresentam características relevantes para serem utilizados como biofertilizantes, mas com diferenças importantes que afetam sua eficácia.

O reator BLC destacou-se por sua maior diversidade microbiana, sugerindo que a presença da carcaça suína favoreceu o desenvolvimento de uma comunidade mais diversa e equilibrada. Essa maior diversidade pode ser indicativa de um biofertilizante mais eficiente e estável para uso em solos agrícolas. Em termos de gêneros benéficos, o BLC apresentou uma abundância maior de microrganismo como *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas*, todos reconhecidos por suas funções cruciais na promoção do crescimento das plantas, fixação de nitrogênio e solubilização de fósforo. Esses gêneros desempenham papéis essenciais para a melhoria da saúde do solo e o desenvolvimento sustentável de culturas, sugerindo que o digestato do BLC tem um grande potencial como biofertilizante.

No caso do reator CSTR, embora também tenha apresentado microrganismo benéficos, como *Bacillus* e *Pseudomonas*, suas proporções foi menores em comparação ao BLC, o que pode indicar que o digestato do CSTR pode ser menos eficiente na promoção do crescimento vegetal e na fertilização do solo. Isso sugere que o digestato do CSTR pode requerer tratamentos complementares ou a adição de nutrientes adicionais para alcançar a mesma eficácia do BLC.

Além disso, o BLC apresentou uma maior abundância de

*Methanoculleus*, uma arqueia envolvida na produção de biogás, indicando maior eficiência na geração de energia por meio da digestão anaeróbica. O controle do pH também se mostrou essencial, uma vez que condições alcalinas podem inibir o crescimento de certas bactérias sensíveis, como *Clostridium*, ao mesmo tempo que favorecem outros microrganismos mais adaptados a pH elevados.

Futuros estudos através de uma análise mais detalhada dos genes envolvidos nas funções biológicas citadas no estudo são necessárias para garantir que as amostras de biodigestatos avaliadas, sejam realmente úteis em aplicações agrícolas como biofertilizante.

## REFERÊNCIAS

AASFAR, A. et al. Agronomic advantage of bacterial biological nitrogen fixation on wheat plant growth under contrasting nitrogen and phosphorus regimes. **Frontiers in plant science**, v. 15, p. 1388775, 2024.

AL SEADI, T. et al. Biogas digestate quality and utilization. **The Biogas Handbook: Science, Production and Applications**. Woodhead Publishing Series in Energy, p. 267-301, 2013.

ALBURQUERQUE, J. A. et al. Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 40, p. 181–189, maio 2012.

ANGELIDAKI, I. et al. Biogas upgrading and utilization: Current status and perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 452–466, mar. 2018.

ASLANZADEH, S. **Pretreatment of cellulosic waste and high-rate biogas production**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:877074/FULLTEXT01.pdf>>. Acesso em: 9 out. 2023. Acesso em: 09 out. 2023

AVARES, W. A. T. **O CLOSTRIDIUM TETANI E O TÉTANO**. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/7wW7fCYqKddncQ5XBw8XVfq/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 22 set. 2024.

**Bioinformatics software**. Disponível em: <<https://www.biobam.com/omicsbox/>>. Acesso em: 3 out. 2024.

BOTELHO, M. H. C.; LYRA, P. G. Revista DAE - Artigo - Interpretação das análises sanitárias de despejos tendo em vista seus tratamentos. Disponível em: . Acesso em: 16 set. 2024.

BRAGA NAN, L. et al. Biomethanation processes: new insights on the effect of a high H<sub>2</sub> partial pressure on microbial communities. **Biotechnology for biofuels**, v. 13,

p. 141, 2020.

BREITWIESER, F. P.; LU, J.; SALZBERG, S. L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1125–1136, 23 set. 2017.

BROWN, B. L. et al. MinION™ nanopore sequencing of environmental metagenomes: a synthetic approach. **GigaScience**, v. 6, n. 3, p. 1–10, 24 fev. 2017.

C BLEY JUNIOR. **Agroenergia da biomassa residual perspectivas energéticas, socioeconômicas e ambientais**. [s.l.] Foz Do Iguaçu: Itaipu Binacional; Brasília, Df:

CAMPANARO, S.; TREU, L.; KOUGIAS, P. G.; ZHU, X.; ANGELIDAKI, I. Metagenomic binning reveals the functional roles of microbial communities in anaerobic digestion. **Environment International**, v. 86, p. 118-127, 2016. Fao, 2009.

CARMO, J. et al. Leaping forward in the treatment of Clostridium difficile infection: Update in 2015. **GE Portuguese journal of gastroenterology**, v. 22, n. 6, p. 259–267, 2015.

CASBIS, G; TORRES, Ó. **Importancia de los fosfatos y fosfitos en la nutrición de cultivos**. Acta Agrícola y Pecuaria, v. 2, n. 3, p. 55–61, 24 out. 2016.

CECHIN, M. Avaliação do uso agrônômico do digestato como biofertilizante oriundo da digestão anaeróbia de resíduos agroindustriais. **www.univates.br**, 1 nov. 2021.

CESTONARO DO AMARAL, A. et al. Capítulo I O PROCESSO DE BIODIGESTÃO. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197604/1/final9154.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2023

CHEN, S. et al. Linkages of Firmicutes and Bacteroidetes populations to methanogenic process performance. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 43, n. 6, p. 771–781, 2016.

CIBIOGÁS. **Central de Bioenergia de Toledo**. Disponível em: <<https://cibiogas.org/central-de-bioenergia-de-toledo/>>. Acesso em: 20 set. 2024.

CIBIOGÁS. **Webinar Panorama de Biogás no Brasil 2022**. Disponível em: <<https://materiais.cibiogas.org/webinar-panorama-do-biogas-no-brasil-2022-agradecimento>>. Acesso em: 20 out. 2023.

COELHO, H. **Regulamentação de insumos agrícolas: fertilizantes orgânicos, condicionadores de solo e substratos**. Workshop insumos para a produção orgânica, 2007. Disponível em: <[https://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2007/workshop/organica/download/insumos\\_fertilizantes.pdf](https://www.cnpma.embrapa.br/eventos/2007/workshop/organica/download/insumos_fertilizantes.pdf)> Acesso em: 19 out. 2023.

CORTÉS-ALBAYAY, C. et al. Comparative genomics of plant growth promoting phosphobacteria isolated from acidic soils. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 117, n. 1, p. 76, 2024.

DE CARVALHO, JC et al. **Produção de Biometano a partir de Vinhaça de Cana em Economia Circular: Desenvolvimentos e Inovações**. *Fermentação*, v. 9, n. 4, pág. 349, 1º abr. 2023. Acesso em: 09 set. 2023

DEGANUTTI, R. et al. **biorreatorES RURAIS: MODELO INDIANO, CHINÊS E BATELADA**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.proceedings.scielo.br/pdf/agrener/n4v1/031.pdf>>. Acesso em: 13 out. 2023.

DE VRIEZE, J.; HENNEBEL, T.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Methanogenesis: ecological relevance and biotechnological applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 5, p. 649-673, 2018.

DIETER DEUBLEIN; STEINHAUSER, A.; ONLINE, W. **Biogas from waste and renewable resources** : an introduction. Weinheim, Germany: Wiley-Vch Verlag Gmbh & Co. Kgaa, 2011.

DOTTO, R. B.; WOLFF, D. B. **Biodigestão e produção de biogás utilizando dejetos bovinos**. *Disciplinarum Scientia | Naturais e Tecnológicas*, v. 13, n. 1, p. 13–26, 2012.

DUFROYER, A.; SOARES, P. **O Segmento do Biogás em Foco: Discussão das Políticas Públicas do Brasil e do Mundo**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://bdm.unb.br/bitstream/10483/20093/1/2017\\_ArturFriedrichDufrayerSch%C3%BCte.pdf](https://bdm.unb.br/bitstream/10483/20093/1/2017_ArturFriedrichDufrayerSch%C3%BCte.pdf)>. Acesso em: 9 out. 2023.

FEAM. **Guia técnico ambiental de biogás na agroindústria**. Fundação Estadual do Meio Ambiente, Federação das Indústrias do Estado de Minas Gerais, Cooperação Alemã para o Desenvolvimento Sustentável (GIZ). Belo Horizonte, 2015.

ILLUMINA. **Illumina | Sequencing and array-based solutions for genetic research**. Disponível em: <<https://www.illumina.com/>>. Acesso em: 13 out. 2023.

ILLUMINA. **Support Illumina | 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation**. Disponível em: <[https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry\\_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf](https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf)> Acesso em: 30 out. 2023.

ILLUMINA. **Support Illumina | Nextera XT DNA Library Prep**. Disponível em: <[https://support.illumina.com/downloads/nextera\\_xt\\_sample\\_preparation\\_guide\\_15031942.htm](https://support.illumina.com/downloads/nextera_xt_sample_preparation_guide_15031942.htm)> Acesso em: 30 out. 2023.

JÉGLOT, A. et al. Microbiome structure and function in woodchip bioreactors for nitrate removal in agricultural drainage water. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 2021.

JENSEN, R. O. et al. Phylogenomics and genetic analysis of solvent-producing *Clostridium* species. **Scientific data**, v. 11, n. 1, p. 1–20, 2024.

JOSHI, N. A., & SICKLE, F. J. N. a sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33)[Software]. 2011.

KERN, T. et al. Assessment of hydrogen metabolism in commercial anaerobic digesters. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 10, p. 4699–4710, 2016.

KIM, B.-R. et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 12, p. 2089–2093, 28 dez. 2017.

KUMAR, A. et al. Insight into physico-chemical properties and microbial community structure of biogas slurry from household biogas plants of sub-Himalaya for its implications in improved biogas production. **International Microbiology**, 18 maio 2024.

LI, Y.; LUO, T.; HU, Z.; WU, M.; WANG, X. Effects of different substrates on anaerobic digestion performance and microbial community in a biogas reactor. **Journal of Environmental Management**, v. 254, p. 109759, 2020.

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, jan. 2011.

LOMAN, N. J.; PALLEEN, M. J. Twenty years of bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 787–794, 9 nov. 2015. Acesso em: 13 out. 2023.

LOPES, A.; GUILHERME, L. I **-FERTILIDADE DO SOLO E PRODUTIVIDADE AGRÍCOLA.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://docs.ufpr.br/~nutricao/plantas/fertisolo.pdf>>. Acesso em: 18 set. 2023

LYU, Z. et al. **Methanogenesis. Current Biology**, v. 28, n. 13, p. R727–R732, jul. 2018.

MACHADO, L. T. S. Aproveitamento de efluente gerado na biodigestão anaeróbia de resíduos orgânicos de origem doméstica na agricultura irrigada. **repositorio.unesp.br**, 28 jul. 2022.

MCBRIDE, A. Produção industrial de vacinas Abordagem original. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www2.ufpel.edu.br/biotecnologia/gbiotec/site/content/paginadoprofessor/uploadsprofessor/2c395d8fb7ba9e0da813d133a281772c.pdf?PHPSESSID=ae96c8bd52c84baaa39ed1381f845a12>>. Acesso em: 09 set. 2023

MIGUEL, M. et al. Composition and functional diversity of bacterial communities during swine carcass decomposition. **Animal Bioscience**, v. 36, n. 9, p. 1453–1464, 1 set. 2023.

NEMMOUR, A. et al. Green hydrogen-based E-fuels (E-methane, E-methanol, E-ammonia) to support clean energy transition: A literature review. **International Journal of Hydrogen Energy**, abr. 2023.

NORDGÅRD, A. S. R. et al. Anaerobic digestion of pig manure supernatant at high ammonia concentrations characterized by high abundances of Methanosaeta and non-euryarchaeotal archaea. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 8 nov. 2017.

NURK, S. et al. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. **Genome research**, v. 27, n. 5, p. 824–834, 2017.

OLIVEIRA, G. S. DE. **biorreator: UMA PROPOSTA DE APROVEITAMENTO DO LIXO ORGÂNICO NO MUNICÍPIO DE SANTARÉM**. Disponível em: <<https://semanaacademica.org.br/biorreator-uma-proposta-de-aproveitamento-do-lixo-organico-no-municipio-de-santar-em>>. Acesso em: 13 out. 2023.

PANTALÉON, V. et al. Biofilms of Clostridium species. **Anaerobe**, v. 30, p. 193–198, 2014.

PARIJA, S. C. Clostridium. Em: **Textbook of Microbiology and Immunology**.

Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 465–488.

PAULO, L. M. et al. Microbial community redundancy and resilience underpins high-rate anaerobic treatment of dairy-processing wastewater at ambient temperatures. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 8, 2020.

**Proveniente da Biodigestão da Vinhaça em Tecnologias para Geração de Eletricidade.** candthesis, 2007.

PEREIRA, A. R. et al. Role of a typical swine liquid manure treatment plant in reducing elements of antibiotic resistance. **Environmental science and pollution research international**, v. 30, n. 40, p. 91803–91817, 2023.

**Posit.** Disponível em: <<https://posit.co/>>. Acesso em: 3 out. 2024.

RAIJ, B. **Fertilidade do solo e adubação.** 343 páginas, SP, Piracicaba: Ceres, Potafos, 1991.

RANSOM-JONES, E. et al. Lignocellulose-degrading microbial communities in landfill sites represent a repository of unexplored biomass-degrading diversity. **mSphere**, v. 2, n. 4, 2017.

ROSE MARIA DUDA et al. A balanced microbiota efficiently produces methane in a novel high-rate horizontal anaerobic reactor for the treatment of swine wastewater. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 152–160, 1 dez. 2015.

SALOMON, K. R. **Avaliação Técnico-Econômica e Ambiental da Utilização do Biogas**

SCHMIDELL, W., LIMA, U. de A., AQUARONE, E., et al. **Biotecnologia Industrial Volume 2.** [S.l.: s.n.], 2001. v. 2.

SIMON, F. W. **Valorização do digestato proveniente da digestão anaeróbia de resíduos alimentares.** 2020. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis,

2020.

SONI, R.; KEHARIA, H. Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming Bacilli. **Planta**, v. 254, n. 3, p. 49, 2021.

SOUZA, J. DE et al. Um método para projeto de plantas de biogás. **Revista ESPACIOS | Vol. 35 (No 10) Año 2014**, 27 nov. 2014.

SUNDBERG, C; ABU AL-SOUD, W.; LARSSON, M.; ALM, E.; SHAKERI YEKTA, S.; SVENSSON, BO H.; SØRENSEN, S. J.; KARLSSON, A. 454-PYROSEQUENCING ANALYSES OF BACTERIAL AND ARCHAEAL RICHNESS IN 21 FULL-SCALE BIOGAS DIGESTERS. *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 85, Issue 3, September 2013, Pages 612–626

SUNG, S.; DAGUE, R. R. Laboratory studies on the anaerobic sequencing batch reactor. **Water environment research: a research publication of the Water Environment Federation**, v. 67, n. 3, p. 294–301, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. A.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal** [recurso eletrônico], [tradução: Alexandra Antunes Mastroberti ... et al.]. 6. Ed, Porto Alegre: Artmed, 2017.

TEODORITA AL SEADI et al. **Biogas handbook**. Esbjerg: University Of Southern Denmark Esbjerg, 2008.

WARD, A. J. et al. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 7928–7940, 1 nov. 2008.

WEBER, L.; DEFORCE, E.; APPRILL, A. Optimization of DNA extraction for advancing coral microbiota investigations. **Microbiome**, v. 5, n. 1, 8 fev. 2017.

WOOD, D. E.; LU, J.; LANGMEAD, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome biology**, v. 20, n. 1, 2019.

WOOD, D. E., & SALZBERG, S. L.. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. **Genome biology**, 15, 1-12, 2014.

XIA, Y. et al. Phosphorus-solubilizing bacteria improve the growth of *Nicotiana benthamiana* on lunar regolith simulant by dissociating insoluble inorganic phosphorus. **Communications biology**, v. 6, n. 1, p. 1039, 2023.

YANG, J. et al. Influence of reflux ratio on the anaerobic digestion of pig manure in leach beds coupled with continuous stirred tank reactors. **Waste management (New York, N.Y.)**, v. 97, p. 115–122, 2019.

YANG, X.-C. et al. Composting swine carcasses with nitrogen transformation microbial strains: Succession of microbial community and nitrogen functional genes. **The Science of the total environment**, v. 688, p. 555–566, 2019.

ZHU, X. et al. Metabolic dependencies govern microbial syntrophies during methanogenesis in an anaerobic digestion ecosystem. **Microbiome**, v. 8, n. 1, 2020