

UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
VISANDO MAIOR EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Munique Marder

Lajeado, fevereiro de 2020.

Munique Marder

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS
VISANDO MAIOR EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na Área de Concentração Detecção e Caracterização de Microrganismos.

Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Camille Eichelberger Granada

Coorientador: Prof. Dr. Odorico Konrad

Lajeado, fevereiro de 2020.

Munique Marder

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS VISANDO MAIOR EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE BIOGÁS

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Detecção e Caracterização de Microrganismos:

Profa. Dra. Dr^a. Camille E. Granada - orientadora
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Prof. Dr. *mont.* Odorico Konrad - coorientador
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Profa. Dra. Daiane Heidrich
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Profa. Dra. Francielle Bucker
Universidade do Vale do Taquari – Univates

Profa. Dra. Luciane Maria Colla
Universidade de Passo Fundo – UPF

Lajeado, fevereiro de 2020.

*“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se: se escolher o mundo
ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo”*

Albert Einstein

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Biomassas residuais: Geração descontrolada e destinação inadequada	15
2.2 Digestão anaeróbia: Alternativa de tratamento de biomassas da pecuária.....	18
2.2.1 Hidrólise e Acidogênese.....	20
2.2.2 Acetogênese	20
2.2.3 Metanogênese.....	21
2.2.4 Fatores que interferem no processo de digestão anaeróbia	22
2.2.4.1 Temperatura do processo anaeróbio	23
2.2.4.2 Potencial Hidrogeniônico – pH	23
2.2.4.3 Relação C/N para produção de biogás.....	24
2.2.4.4 Inibição e Toxicidade.....	24
2.2.5 Microrganismos	25
2.3 Subprodutos gerados na digestão anaeróbia.....	26
3 JUSTIFICATIVA	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo geral	30
4.2 Objetivos específicos	30

5 CAPÍTULO I - THE USE OF AN INOCULANT ON BIOGAS PRODUCING REACTORS IMPROVE THE POTENTIALITIES OF THE PROCESS AT SLIGHTLY LOW TEMPERATURES 31

5.1. Introduction.....	35
5.2. Material and Methods	38
5.2.1 Inoculant preparation.....	38
5.2.2 Physicochemical characterization of the inoculant	39
5.2.3 Identification of microbial communities present in inoculants	39
5.2.4 Anaerobic digestion experiment – determination of inoculant efficiency	40
5.2.5 Biochemical Biogas/Methane Potential	40
5.2.6 Statistical analysis	41
5.3. Results and Discussion	42
5.3.1. Inoculant preparation and characterization.....	42
5.3.2. Efficiency of inoculants as starter of anaerobic digestion process.....	45
5.4. Conclusions.....	49
5.5. Acknowledgements	49
5.6. References	50

6 CAPÍTULO II - ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS PARA FORMULAÇÃO DE UM INOCULANTE VISANDO ACELERAR A DEGRADAÇÃO DE RESÍDUOS ORGÂNICOS AGRÍCOLAS EM BIODIGESTORES 67

6.1 Objetivo	68
6.2 Materiais e métodos	68
6.2.1. Isolamento de microrganismos.....	68
6.2.2. Identificação dos microrganismos isolados	69
6.2.3. Ensaio de digestão anaeróbia	69

6.3. Resultados e discussão.....	71
6.3.1 Isolamento e identificação de microrganismos.....	71
6.3.2. Ensaio de digestão anaeróbia	72
6.4. Perspectivas.....	76
7 DISCUSSÃO GERAL	77
8 CONCLUSÕES	79
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço aos meus pais Valquiria Marder e Vanderlei Marder por todo apoio, carinho, amor e confiança que depositaram em mim para a realização desta nova conquista.

Ao meu namorado Luciano Haas, por todo amor, carinho, paciência, dedicação e auxílio em todos os momentos deste período de mestrado.

A minha querida e amiga orientadora Camille E. Granada, por acreditar em mim e me motivar todos os dias para dar continuidade na vida acadêmica.

Ao meu coorientador e gestor Odorico Konrad, pelo apoio, paciência, sugestões e por acreditar neste projeto.

A equipe e bolsistas do Centro de Pesquisa em Energias e Tecnologias Renováveis e do projeto de pesquisa “Seleção e caracterização de microrganismos com potencial uso biotecnológico”, que não mediram esforços para me auxiliar no desenvolvimento deste projeto.

Especialmente ao Arthur, Emílio, Eugênia, Júlia, Marina, Marciana, Camila e Maíra.

Aos meus familiares e amigos que entenderam a minha ausência nos encontros e eventos importantes de suas vidas.

A Univates e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por me proporcionar a possibilidade de receber uma bolsa taxa para realização do mestrado, sem ela esse sonho não seria conquistado.

RESUMO

Os setores agrícolas e agroindustriais geram resíduos ricos em matéria orgânica, principalmente os dejetos animais. Estes, por sua vez, podem ser degradados por processos biológicos e aproveitados como biomassas na geração de bioenergia em sistemas de digestão anaeróbia. O uso de co-digestão pode otimizar a produção de biogás e metano e, ao final do processo, servir como inoculante na iniciação dos processos de digestão anaeróbia. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi desenvolver, caracterizar e avaliar a eficiência de inoculantes, utilizando co-digestão anaeróbica de diferentes resíduos do agronegócio como biomassa em temperatura controlada e ambiente, e formular um inoculante com uma mistura de microrganismos isolados visando otimizar a produção de biogás e metano. Para isto, foram preparados quatro inoculantes (constituídos de dejetos suíno, aves e bovino), que foram incubados anaerobicamente por 72 dias e aclimatados em temperatura controlada (35° C) e ambiente (28 ± 3,5° C). Um inoculante, em cada temperatura, foi alimentado com uma mistura de celulose microcristalina, gelatina, lactose e resíduo de óleo de cozinha. Ao final, a identificação da comunidade microbiana mostrou que os inoculantes apresentaram diferenças importantes entre as duas temperaturas avaliadas, Bacteroidetes foi o filo mais representativo em inoculantes a 28° C e Firmicutes a 35° C, e destaca-se que o uso dos inoculantes (alimentado e não alimentado) melhora o rendimento da produção de biogás e metano a 28 °C, atingindo valores semelhantes na faixa ideal de temperatura (35° C). O isolamento de 10 microrganismos anaeróbicos facultativos dos inoculantes mostrou que eles pertencem ao filo Firmicutes, famílias *Paenibacillaceae* e *Bacillaceae*. A adição desta mistura de microrganismos não melhorou a produção de biogás nas diferentes temperaturas, no entanto, mais testes serão necessários para avaliar o potencial destes microrganismos. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que o uso de inoculantes em sistemas de digestão anaeróbica melhora a eficiência da produção de biogás e metano em temperaturas inferiores (28 °C ±3,5) a considerada ideal (35 °C), o que pode permitir o uso desse tipo de produção de energia nas regiões que apresentam temperaturas ligeiramente mais baixas.

Palavras-chave: Biodigestão anaeróbia. Inoculante. Co-digestão. Temperatura ambiente.

ABSTRACT

The agricultural and agroindustrial sectors generate waste rich in organic matter, mainly animal waste. These wastes can be degraded by biological processes and used as biomass in the generation of bioenergy. The use of co-digestion can optimize the production of biogas and methane and, at the end of the process, the biomass can be used as inoculant for a new anaerobic digestion process. In this sense, the objective of this study was to develop, characterize and evaluate the efficiency of inoculants, using anaerobic co-digestion of different residues from agribusiness as biomass at controlled and environmental temperature, and to formulate an inoculant with a mixture of isolated microorganisms in order to optimize production of biogas and methane. For this purpose, four inoculants (composed by swine, poultry and bovine manures) were incubated anaerobically for 72 days and acclimatized under controlled (35 °C) and environmental (28 ± 3.5 °C) temperatures. One inoculant of each temperature was fed with a mixture of microcrystalline cellulose, gelatin, lactose and cooking oil residue. In the end of inoculant preparation, the identification of the microbial showed that inoculants presented important differences between the two temperatures evaluated, Bacteroidetes was the most representative phylum in inoculants at 28 °C and Firmicutes at 35 °C. The use of inoculants (fed or non-fed) improves the yield of biogas and methane production at 28 °C, reaching similar values to ideal temperature range (35 °C). The isolation of 10 facultative anaerobic microorganisms from the inoculants showed that they belong to the phylum Firmicutes, *Paenibacillaceae* and *Bacillaceae* families. The addition of mixture of these microorganisms did not improve the biogas production at different temperatures, however, more tests will be needed to evaluate the potential of these microorganisms. From the results obtained, it can be concluded that the use of inoculants in anaerobic digestion systems improves the efficiency of the biogas production and methane at lower temperatures (28 °C ±3.5) than that considered ideal (35 °C), which may allow the use of this type of energy production in regions with slightly lower temperatures.

Keywords: Anaerobic biodigestion. Inoculant. Co-digestion. Room temperature.

1 INTRODUÇÃO

As práticas intensivas de criação de animais vêm causando impactos ambientais como poluição da água por nitratos e eutrofização, poluição do ar (emissões de amônia e gases de efeito estufa) e poluição do solo por causa do acúmulo de nutrientes, devido a destinação inadequada dos efluentes da pecuária (MARTINEZ et al., 2009). Portanto, uma alternativa que pode auxiliar na redução dos impactos ambientais gerado por esta atividade é o uso de biodigestores anaeróbicos como uma das fases no tratamento destes resíduos.

A digestão anaeróbica (DA), além de auxiliar no tratamento de resíduos orgânicos, gera um material mais estabilizado e com menor carga orgânica (digestato). Este processo é uma alternativa para ampliar a matriz energética renovável brasileira pela produção de biogás, e reduzir a emissão de poluentes na atmosfera. O biogás é gerado pela ação de microrganismos, que degradam a matéria orgânica biodegradável de uma biomassa, na ausência de oxigênio, atuando de forma sinérgica e simbiótica (CARRILHO, 2012; SOARES; FEIDEN e TAVARES, 2017; HOSSEINI, 2014).

A composição do biogás é variável, podendo ser modificada de acordo com o tipo de biomassa e o metabolismo dos microrganismos. Bactérias acidogênicas e archaea metanogênicas produzem o metano por relações sintróficas e, suas

diferentes necessidades nutricionais e sensibilidade às condições ambientais geram diferentes cinéticas de crescimento, quando se tratando de um sistema descontínuo (VENTORINO et al., 2018). Portanto, devido as bactérias acidogênicas se desenvolverem mais rapidamente do que as archaea metanogênicas (TABATABAEI et al., 2010) o controle das características físico-químicas do sistema é determinante para o seu equilíbrio.

O desenvolvimento de projetos de biodigestão anaeróbia está em ascendência, e novas tecnologias estão sendo pensadas constantemente. No entanto, no Rio Grande do Sul, variações nas condições ambientais, principalmente temperatura, pode inviabilizar o desenvolvimento de biodigestores, devido a necessidade de aquecimento. Por isso, estudos sobre diferentes condições ambientais e uso de inoculantes para auxiliar no desenvolvimento do processo digestão anaeróbia são necessários para melhorar a produção de biogás e contribuir na redução de custos operacionais dos biodigestores.

Além disso, o processo de co-digestão anaeróbia, que consiste no tratamento combinado de vários resíduos com características diferentes, também é uma opção confiável que pode otimizar a produção de biogás, mas devido a sua complexidade, há necessidade de ser investigado com maior minuciosidade. A co-digestão de diferentes biomassas amplia a diversidade microbiana de um substrato, tornando esta opção interessante para ser utilizada como inóculo. O inóculo é um material essencial na garantia de estabilidade a longo prazo da digestão anaeróbia e na iniciação da operação de um digestor (DECHRUGSA et al., 2013).

Desta forma, o preparo de um inoculante eficiente e o conhecimento da estrutura da comunidade microbiana do mesmo é essencial para a otimização da produção e da qualidade do biogás. Da mesma forma, identificar possíveis condições

ambientais, principalmente redução de temperatura, sem baixar o rendimento da produção e a qualidade do biogás é essencial para o desenvolvimento do sistema de biodigestores em regiões de clima temperado, com custos operacionais minimizados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta revisão bibliográfica serão abordados os principais aspectos relacionados ao tratamento de biomassas residuais por processo de digestão anaeróbia, especificamente sobre os microrganismos presentes em ambientes anaeróbios, e a interferência de alterações na temperatura durante a conversão das biomassas em uma fonte alternativa de energia renovável, o biogás.

2.1 Biomassas residuais: Geração descontrolada e destinação inadequada

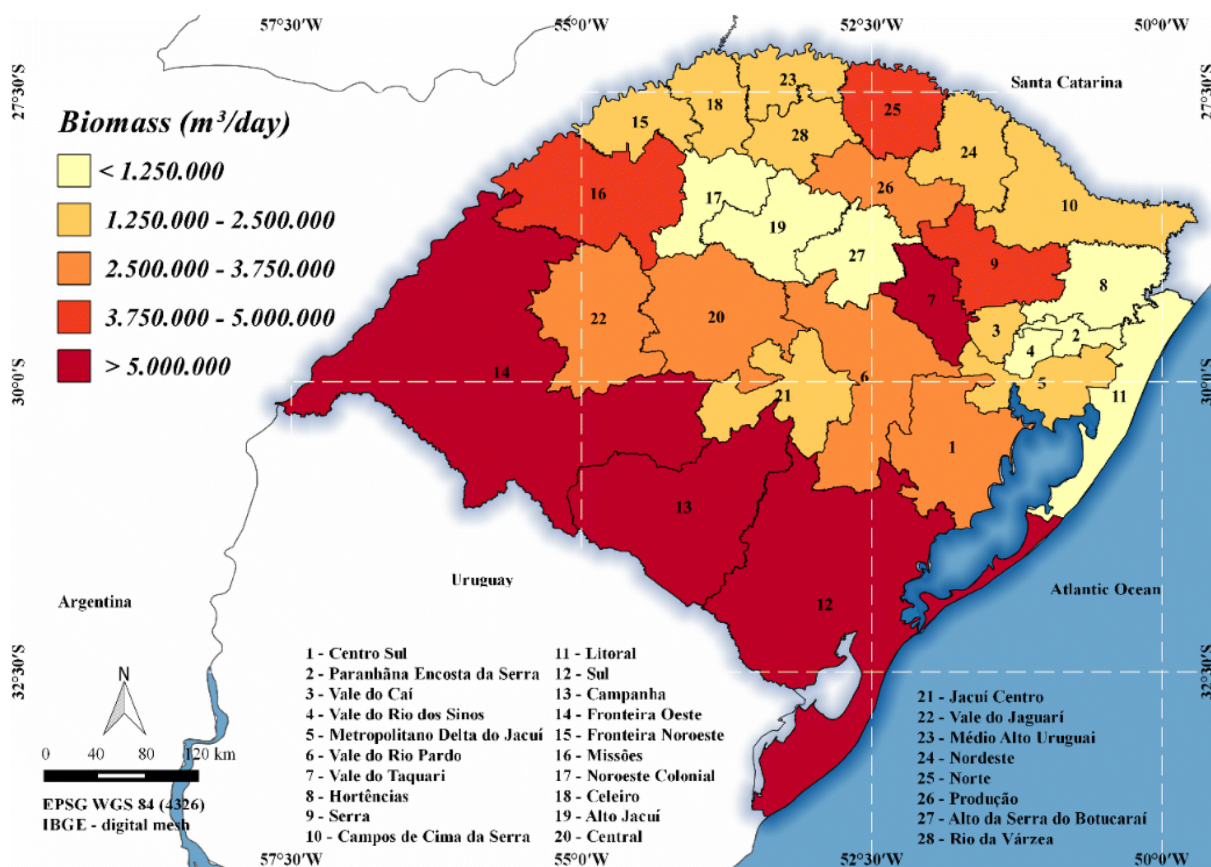
Com o progresso no desenvolvimento da agricultura, a produção de alimentos expandiu e os sistemas agrícolas ficaram mais intensivos. Desta forma, surgiu um novo ramo industrial responsável pelo seguimento da produção primária de alimentos, a chamada agroindústria. A agropecuária traz muitas vantagens ao país como geração de empregos, maior contribuição ao desenvolvimento, mais alimentos e riqueza. No entanto, nos setores da agropecuária e agroindústria existe pouca preocupação com a geração de resíduos e o seu destino e/ou tratamento, uma vez que estes são altamente impactantes ao meio ambiente quando não manejados de forma correta (MATEO-SAGASTA et al., 2017).

Estes resíduos podem ser utilizados como biomassas na geração de bioenergia. Os materiais ricos em carbono como sobras de madeira, vegetais, alimentos, dejetos, esgotos domésticos, efluentes industriais, e vários outros elementos com alto potencial de degradação por processos biológicos podem ser utilizados. A degradação destes materiais em ambiente anaeróbico pela ação de microrganismos gera um produto com elevada capacidade energética, chamado biogás (OLIVEIRA, 2011).

Segundo Konrad et al. (2016) e Guerini Filho et al. (2019), no Rio Grande do Sul a geração estimada de biomassas é de aproximadamente 85 milhões de toneladas por ano distribuídas por Conselhos Regionais de Desenvolvimento – COREDEs (FIGURA 1). As biomassas que apresentam maior geração são as da pecuária como os dejetos de bovinos (62,48%), os dejetos de suínos (19,68%), os dejetos de aves (9,91%), os dejetos de ovinos (2,84%), os dejetos de equinos (2,38%), e as biomassas de origem agroindustrial (2,42%) e de vinícolas (0,35%) (KONRAD et al., 2016). De acordo com IPEA (2012), a suinocultura é a criação de animal com maior potencial poluidor, seguida da bovinocultura e da avicultura.

Para Tilman et al. (2002), os avanços tecnológicos e as atuais forças econômicas aumentaram a disponibilidade de alimentos e diminuíram os custos reais das mercadorias agrícolas nos últimos 50 anos. Isto resultou na intensificação das práticas agrícolas, e conseqüentemente na degradação ambiental, perda de biodiversidade e de serviços ecossistêmicos, surgimento de patógenos e instabilidade da produção agrícola a longo prazo.

Figura 1 - Mapa da geração estimada de biomassas no Rio Grande do Sul



Fonte: Konrad et al. (2016).

Diante destas problemáticas, uma das soluções para reduzir a destinação descontrolada de grandes quantidades de resíduos alimentares e agroindustriais é utilizar estas biomassas residuais para a produção de combustível renovável. Esta produção é uma alternativa eficaz para o tratamento destas biomassas em um processo de digestão anaeróbica (DA), visando a produção de biogás (ZHANG et al., 2014; FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

Assim, além de contribuir como fonte renovável para a matriz energética brasileira por meio da geração de energia (IPEA, 2012), a biomassa resultante do processo de digestão anaeróbica pode ser utilizada como um biofertilizante. O biofertilizante além de reduzir a dependência de adubos químicos importados, assegura a sustentabilidade do crescimento da produção agrícola, minimiza a

acumulação de resíduos, mantém um controle da poluição, proporcionando melhores condições de saúde pública.

2.2 Digestão anaeróbia: Alternativa de tratamento de biomassas da pecuária

Os resíduos resultantes das criações de animais e indústrias primárias da agricultura e da pecuária, quando não manejados, tratados e destinados adequadamente geram impactos negativos na região de geração, como geração de gases (intensificação do efeito estufa, emissão de odores, risco a saúde ambiental), saturação do solo (toxicidade, comprometimento da fertilidade dos solos), proliferação de vetores, eutrofização de recursos hídricos, contaminação dos solos e das águas e seleção de espécies da fauna e flora (perda da biodiversidade) (IPEA, 2012).

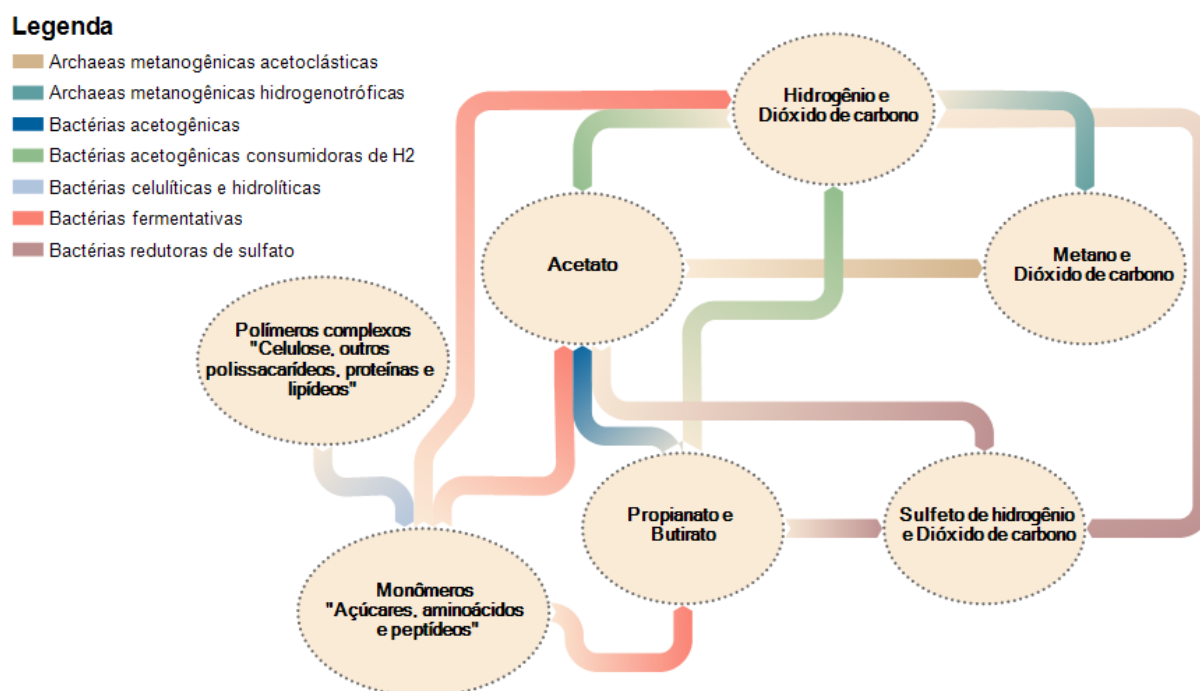
No entanto, este material pode ser usado como biomassa em biorreatores de digestão anaeróbica. Segundo Tufaner e Avşar (2016), a digestão anaeróbia pode ser potencializada quando utilizada a co-digestão (mistura de diferentes biomassas em um reator anaeróbio). De acordo com os autores, o uso de monodigestão e co-digestão com dejetos bovinos e resíduos orgânicos, confirmam que os biodigestores alimentados com um único tipo de substrato reduzem a eficiência na geração de biogás. Para eles, a co-digestão com dejetos bovinos apresenta um bom desempenho na degradação da matéria orgânica, permitindo controlar qualquer desequilíbrio no processo e melhorar a produção de biogás com um desempenho efetivo do biorreator (TUFANER e AVŞAR, 2016; APPELS et al., 2011).

No entanto, o conhecimento das características das biomassas inseridas nos biodigestores, como sólidos totais, nitrogênio amoniacal total e a relação entre demanda química de oxigênio solúvel (SDQO) e a demanda química de oxigênio (DQO), é muito importante para o processo, pois interferem na estrutura da

comunidade microbiana, afetando o processo de degradação da matéria orgânica (HAN et al., 2017).

O processo de degradação da matéria orgânica tornou-se uma tecnologia significativamente popular nas últimas duas décadas, o que levou à intensificação do conhecimento dos aspectos microbiológicos ao longo do tempo, principalmente os referentes à identificação da diversidade dos microrganismos envolvidos no processo de produção do biogás (NARIHIRO e SEKIGUCHI, 2007). Assim, sabe-se que a produção de biogás é realizada por uma ampla diversidade de microrganismos (FIGURA 2) em diferentes fases: hidrólise, fermentação, acetogênese e metanogênese (SCHNÜRER, 2016). No entanto, Narihiro e Sekiguchi (2007) acreditam que ainda existe um vasto campo a ser explorado para obtenção de informações das funções dos microrganismos nos processos de digestão anaeróbia.

Figura 2 – Microrganismos envolvidos no processo de digestão anaeróbia



Fonte: Adaptado de Khanal, (2009).

2.2.1 Hidrólise e Acidogênese

Na digestão anaeróbia, a degradação da matéria orgânica é iniciada pelo processo de hidrólise, no qual, as enzimas extracelulares são excretadas por bactérias fermentativas hidrolíticas, que transformam os compostos complexos (polímeros orgânicos) em simples, como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, purinas e pirimidinas (MADIGAN et al. 2016). Durante a fermentação destes compostos simples são produzidos ácidos orgânicos voláteis, álcoois, ácido láctico, dióxido de carbono (CO₂), hidrogênio (H₂), amônia (NH₃) e o ácido sulfídrico (H₂S), sendo os quatro primeiros compostos gerados em maior quantidade nestas etapas (LORA; VENTURINI, 2012; BIASI et al., 2018).

Liu et al (2017) estudaram três diferentes inóculos: um de uma usina de biogás operada com lodo de estação de tratamento de águas residuais, outro com vinhaça e por último um inóculo com resíduos agrícolas (esterco e silagem de capim). Os autores mostraram que os microrganismos mais abundantes nos reatores anaeróbios foram do filo Bacteroidetes, principalmente as *Bacteroidaceae* e *Porphyromonadaceae* e os do filo Firmicutes, principalmente os *Clostridium* spp., que realizam o processo de hidrólise, respiração anaeróbia e fermentação.

2.2.2 Acetogênese

Os compostos gerados na fase anterior são oxidados pelas bactérias acetogênicas a acetato, H₂ e CO₂, e destes apenas o acetato e H₂ são metabolizados pelos microrganismos metanogênicos para produção de metano (LORA; VENTURINI, 2012). A redução de CO₂ a acetato pelos microrganismos acetogênicos é realizada pela via do acetil-CoA, principal via de anaeróbicos obrigatórios para oxidação ou produção de acetato. Os principais microrganismos que utilizam esta via

para o metabolismo energético são: *Acetoanaerobium noterae*, *Acetobacterium woodii*, *Acetobacterium wieringae*, *Acetogenium kivui*, *Acetitomaculum ruminis*, *Clostridium aceticum*, *Clostridium formicaceticum*, *Moorella thermoacetica*, *Desulfotomaculum orientis*, *Sporomusa paucivorans* e *Treponema primitia* (MADIGAN et al. 2016). As bactérias *Acetobacterium woodii* e *Clostridium aceticum* podem se desenvolver quimiorganotroficamente pela fermentação de açúcares ou quimiolitotrófica e autotroficamente pela redução de CO₂ a acetato, utilizando o H₂ como doador de elétron (MADIGAN et al., 2016).

2.2.3 Metanogênese

Os microrganismos metanogênicos produzem metano a partir de CO₂, H₂, metanol, metil-aminas e acetato (MADIGAN et al., 2016). Estes microrganismos fazem parte do domínio Archaea (TABELA 1). Este grupo de microrganismos é bastante diverso, e é composto por microrganismos procariontes termofílicos e halofílicos, e que possuem particularidades altamente específicas de substrato e condições de vida, o que os torna, o grupo mais sensível de todo o processo anaeróbico (KIM; WHITMAN, 2014).

A interação das Archaea metanogênicas com os microrganismos acetogênicos deve ocorrer em simbiose, pois qualquer interferência no processo acetogênico pode influenciar o desenvolvimento dos metanogênicos, limitando a geração e composição do biogás (DEUBLEIN e STEINHAUSER, 2008).

Tabela 1 - Substratos utilizados por algumas Archaea metanogênicas

Substratos	Archaeas metanogênicas
H₂ + CO₂	<i>Methanothermobacter, Methanocaldococcus, Methanoterris</i>
H₂ + CO₂, formato	<i>Methanobacterium, Methanobrevibacter, Methanothermobacter, Methanothermococcus, Methanomicrobium, Methanogenium, Methanospirillum, Methanoplanus, Methanofolius,</i>
Metanol + H₂	<i>Methanosphaera</i>
H₂ + CO₂, piruvato + CO₂, formato	<i>Methanococcus</i>
H₂ + CO₂, formato, álcoois	<i>Methanocorpusculum</i>
H₂ + CO₂, álcoois, formato	<i>Methanoculeus</i>
H₂ + CO₂, álcoois	<i>Methanolacinia</i>
H₂ + CO₂, metanol, metil-aminas, acetato	<i>Methanosarcina</i>
Metanol, metil-aminas	<i>Methanolobus, Methanohalobium, Methanococcoides, Methanomicrococcus</i>
Metanol, metil-aminas, metil-sulfetos	<i>Methanohalophilus</i>
Acetato	<i>Methanosaeta</i>
Metanol, metil-aminas, dimetil-sulfeto	<i>Methanosalsum</i>

Fonte: Adaptado de Madigan et al., 2016.

2.2.4 Fatores que interferem no processo de digestão anaeróbia

Os microrganismos presentes em reatores anaeróbios são sensíveis a mudanças nas condições dos reatores e, devido a isso, é necessário evitar mudanças bruscas no processo. Pequenas alterações podem provocar um desequilíbrio e afetar o desempenho da digestão anaeróbia, podendo até resultar na interrupção do processo (SOARES; FEIDEN; TAVARES, 2017).

2.2.4.1 Temperatura do processo anaeróbio

Microrganismos metanogênicos são sensíveis a variações de temperatura, sendo que qualquer mudança rápida pode gerar queda na sua atividade. Portanto, a temperatura deve ser mantida em faixas ótimas para cada sistema, no caso de sistemas mesofílicos a faixa deve ser de 32 a 42°C e termofílicos de 48 a 55°C (DEUBLEIN; STEINHAUSER, 2008).

De acordo com Gebreyessus e Jenicek (2016), o sistema mesofílico é o método mais utilizado em processos de digestão anaeróbia, devido à sua estabilidade de operação e menor exigência de energia para o aquecimento do reator. Já o sistema termofílico apresenta maior eficiência na desinfecção de patógenos, aumento na taxa de produção de metano e necessidade de menor volume do digestor devido à redução do tempo de retenção hidráulica.

2.2.4.2 Potencial Hidrogeniônico – pH

Segundo Deublein e Steinhauser (2008), o pH ótimo para microrganismos metanogênicos é de neutro a levemente alcalino (entre 6.7 e 7.5). Com valores abaixo de 6,5, a produção dos ácidos orgânicos aumenta e resulta na redução do valor de pH pelas bactérias hidrolíticas e possivelmente à interrupção da fermentação. Este fenômeno é observado na degradação de resíduos pobres em celulose e ricos em açúcar, pois os últimos são facilmente degradados para ácidos graxos voláteis pelas bactérias fermentativas, o que leva a diminuição do pH e a proliferação deste tipo de bactérias. Esta proliferação leva ao crescimento lento dos microrganismos metanogênicos, que são intolerantes a baixo pH, e que resulta no estresse e inibição de suas atividades metabólicas (LI et al., 2017).

2.2.4.3 Relação C/N para produção de biogás

A concentração de macro e micronutrientes em um processo de tratamento de resíduos orgânicos deve ser adequada para que o sistema opere com êxito (BOHRZ, 2010). Substratos com uma relação Carbono/Nitrogênio (C/N) ótima (20 a 30/1) fornecem nutrientes suficientes para microrganismos, maximizando a produção de biogás. Já valores mais baixos de C/N (na faixa de 8 a 10/1) podem levar a maiores concentrações de amônia, impedindo o crescimento microbiano. Portanto, qualquer alteração da relação C/N das biomassas pode causar uma variação nos microrganismos do domínio bactéria, interferindo no desenvolvimento de archaeas metanogênicas (XU et al., 2018).

Hasan et al., (2018) avaliaram co-digestões compostas por esterco suíno combinado em diferentes proporções (de 0 a 100%) com lodos e sangue de uma cooperativa de suínos e aves, e identificou que os maiores volumes de biogás e metano foram obtidos em co-digestões com menores percentuais de dejetos suíno, onde a quantidade inicial de carbono é maior. Neste estudo as co-digestões apresentaram relação C/N inicial menor que 7/1 e produziram volumes de biogás que variaram 3,37 L da amostra com 100% de dejetos suíno a 18,76 L da amostra com 10% de dejetos suíno. Segundo os autores, acredita-se que um aumento na relação C/N com o suprimento de carbono pode melhorar a produção de biogás e metano.

2.2.4.4 Inibição e Toxicidade

Os resíduos empregados como substrato para digestão anaeróbia podem apresentar substâncias tóxicas ou inibitórias, como metais pesados, amônia, antibióticos ou surfactantes (JHA; SCHMIDT, 2017). O acúmulo de tais substâncias

nos resíduos e no processo pode ocasionar redução nos rendimentos de metano, podendo gerar um colapso do processo (JHA; SCHMIDT, 2017).

2.2.5 Microrganismos

Embora a biodigestão seja um processo biológico dependente de uma cooperação complexa de numerosas espécies de microrganismos com diferentes capacidades metabólicas, a influência da estrutura da comunidade microbiana na atividade do biodigestor, assim como sua estabilidade, ainda tem muito a ser investigada (VENKITESHWARAN et al., 2015). Para Hidaka, Tsushima, e Tsumori, (2018), o método mais eficiente para identificação de microrganismos é o sequenciamento de um fragmento do gene *16S rRNA* de procariotos. Esta identificação, juntamente com os parâmetros convencionais de caracterização da biomassa como sólidos totais (ST), sólidos voláteis (SV), pH e produção de biogás, auxiliam de forma eficiente no manejo da biodigestão anaeróbica.

Ziganshina et al. (2014) avaliou a comunidade microbiana de digestatos compostos por dejetos suíno e aves e constatou que filo bacteriano predominante foi Firmicutes, onde estão classificados bactérias do gênero *Clostridium*. E em relação às archaeas metanogênicas, foram encontrados em níveis mais significativos microrganismos do gênero *Methanosarcina*, e metanogênicos hidrogenotróficos do gênero *Methanoculleus* sp.

Guo et al., (2015) verificaram em um lodo de digestor anaeróbico de estação de tratamento de efluentes que a classe Clostridia e a família *Bacteroidaceae* são os fermentadores dominantes no sistema de digestão anaeróbico, e que as bactérias do gênero *Clostridium* desempenham um papel importante na produção de acetato (acetogênese). Os autores também verificaram uma alta proliferação de

metanogênicos acetoclásticos (gêneros *Methanosaeta* e *Methanosarcina*), o que sugere que a metanogênese acetoclástica pode ser a via dominante no digestor anaeróbico.

Granada et al., (2018) verificaram que, em um sistema anaeróbico com resíduos de frigoríficos de aves, suíno e de indústria de laticínio, o elevado volume de biogás e metano estava relacionado à família das archaeas *Methanobacteriaceae* e das bactérias *Porphyromonadaceae* e *Tissierellaceae*.

Appels et al., (2011) entendem que é necessário ampliar os campos de pesquisa para otimizar os processos de digestão anaeróbia, principalmente na identificação da dinâmica da comunidade microbiana durante a digestão, na extensão dos modelos de digestão anaeróbica existentes através da inclusão de dados da comunidade microbiana, o desenvolvimento adicional e a otimização dos métodos de pré-tratamento para melhorar a digestão anaeróbia de biomassas e resíduos e a purificação do biogás obtido. Isso foi confirmado por Granada et al., (2018), que identificaram que cerca de 50% das sequências de genes analisadas em um sistema de digestão anaeróbio não foram classificadas no nível do gênero, mostrando que grande parte da microbiota dos reatores ainda é desconhecida e que o conhecimento sobre mudanças na composição microbiana e sua dominância pode auxiliar na manipulação, isolamento e inoculação dos microrganismos dentro dos biodigestores para maximizar a produção de metano.

2.3 Subprodutos gerados na digestão anaeróbia

A digestão anaeróbia atua no tratamento de biomassas residuais (OLIVEIRA et al., 2011), e durante a degradação da matéria orgânica, realizada pela ação de microrganismos, gera dois produtos: um digestato com menor carga orgânica, que

poderá ser usado como fertilizante para as culturas agrícolas (BHARATHIRAJA et al., 2018) e o biogás, que pode ser utilizado como energia térmica, elétrica e combustível (SCARLAT; DALLEMAND; FAHL, 2018).

O processo de digestão anaeróbia além de auxiliar na redução da emissão de gases do efeito estufa, na eliminação de patógenos e de odores, possibilita a bioestabilização da matéria orgânica, gerando um biofertilizante agrícola de ótima qualidade, que após bioestabilizado tem potencial para ser disperso em solo, desde que as características deste material não ultrapassem a capacidade do solo para absorvê-los e armazená-los, reduzindo, assim, os impactos negativos (IPEA, 2012).

O digestato é o resíduo gerado após o processo de digestão anaeróbia. Este apresenta teores de C, N, P, K e micronutrientes (B, Fe, Zn, Mn, Cl e Cu), que pode favorecer o desenvolvimento de plantas e microrganismos, o que possibilita sua utilização como biofertilizante (ALBURQUERQUE et al., 2012). Além disso, ele também pode ser aproveitado como inóculo para iniciar reatores anaeróbios para uma nova geração de biogás (LIU et al., 2017).

Desta forma, o crescente desenvolvimento da produção de biogás e de biometano oferecem novas oportunidades para o seu aproveitamento e substituição de combustíveis fósseis no setor de transporte, no uso do calor e no abastecimento de rede, seja ela eletricidade ou de gás natural, e sua aplicabilidade é imprescindível para sua inserção como maior parcela de fonte de energia renováveis alternativas (SCARLAT; DALLEMAND; FAHL, 2018).

No Brasil o principal obstáculo para o desenvolvimento do potencial de biogás está na dificuldade de alcançar a viabilidade econômica, uma vez que o custo de geração de energia a partir do biogás, em geral, é superior à tarifa de venda de energia

atualmente no mercado, e, portanto, é necessário o desenvolvimento de tecnologias para reduzir o custo de geração do biogás (SILVA DOS SANTOS et al., 2018).

3 JUSTIFICATIVA

O aumento do consumo energético dos últimos anos, o interesse de países importadores em reduzir a dependência do petróleo e a necessidade de diminuir os problemas ambientais associados ao uso de combustíveis fósseis vêm direcionando esforços de empresas, dos governos e do meio acadêmico para desenvolver estudos de potenciais fontes renováveis de energia. As atividades agrícolas, especialmente a pecuária estão desencadeando uma série de preocupações ambientais devido a destinação inadequada dos dejetos animais em solos agrícola, e uma alternativa de destinação adequada para estes resíduos é a instalação de sistemas de biodigestão anaeróbia, onde o biogás gerado pode ser aproveitado como energia. Desta forma, avaliar condições ambientais que possam minimizar o custo operacional de biodigestores instalados em regiões com temperaturas ligeiramente mais baixas, reduzindo os custos com sondas de aquecimento, e encontrar alternativas para acelerar a degradação anaeróbia com o uso de inoculantes eficientes são opções interessantes para o desenvolvimento do biogás.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar a comunidade microbiana de inoculantes aclimatados em temperatura controlada e ambiente, e avaliar sua aplicabilidade em sistema de digestão anaeróbia, buscando potencialização da conversão da matéria orgânica em biogás.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar e monitorar quatro inoculantes, dois aclimatados em temperatura controlada e dois na temperatura ambiente;
- ✓ Identificar a comunidade microbiana de cada inoculante por técnicas de biologia molecular;
- ✓ Caracterizar os inoculantes e avaliar o uso dos inoculantes em sistema de co-digestão anaeróbia para potencialização da produção de biogás e metano;
- ✓ Isolar e identificar os microrganismos dos inoculantes;
- ✓ Avaliar o potencial de produção de biogás da co-digestão (dejeito bovino, suíno e aves) com inoculação dos microrganismos isolados.

5. CAPÍTULO I

The use of an inoculant on biogas producing reactors improve the potentialities of the process at slightly low temperatures

Manuscrito submetido na revista **Journal of Cleaner Production**

The use of an inoculant on biogas producing reactors improve the potentialities of the process at slightly low temperatures

MunIQUE Marder^a, Francielle Bucker^a, Odorico Konrad^b, Letícia Marconatto^c, Luiz Gustavo dos Anjos Borges^c, Adriana Giongo^{c,d}, Camille E. Granada^{a*}

^a Universidade do Vale do Taquari - Univates, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rua Avelino Tallini 171, Lajeado, RS, Brazil

^b Universidade do Vale do Taquari - Univates, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Rua Avelino Tallini 171, Lajeado, RS, Brazil

^c Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais -IPR, Av. Ipiranga 6681, Porto Alegre, RS, Brazil

^d Universidade Regional de Blumenau - FURB, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Rua São Paulo, 3250, Blumenau, SC, Brazil

*corresponding author.

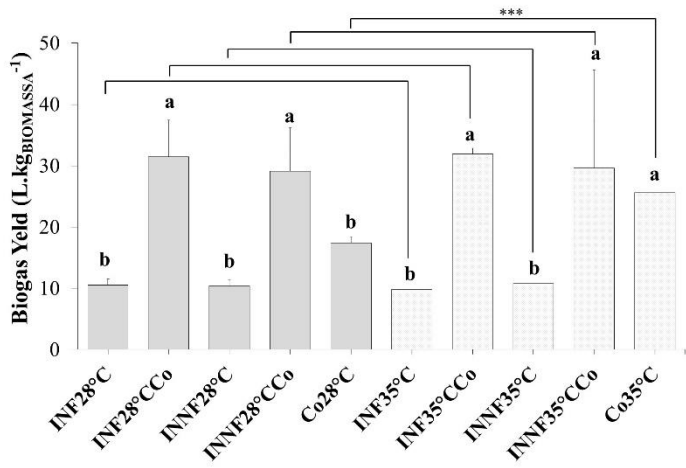
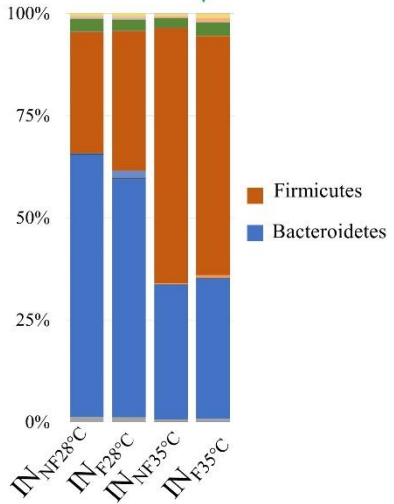
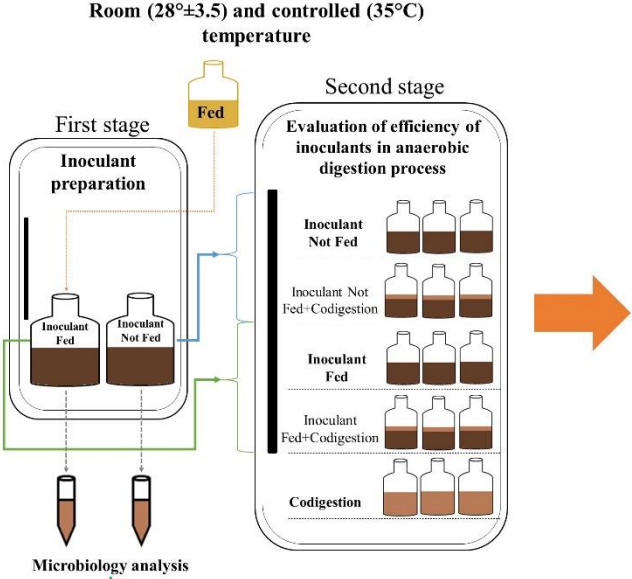
e-mail: cegrana@univates.br

Abstract

Agriculture and agribusiness generate waste rich in organic matter which a pivotal role in the biogas chain. Thus, this work aimed to develop an efficient inoculant for methane production using anaerobic codigestion of different agribusiness residues as biomass in a slightly low temperature. Inoculant preparation, microbial community structure and anaerobic digestion efficiency were evaluated with and without heating (constant 35°C and room temperature 28 ± 3.5 °C). The microbial communities identified in inoculants showed important differences between the two temperatures evaluated. Bacteroidetes was the most representative in inoculants at 28° C, and Firmicutes at 35° C. The results of the conversion of biogas with inoculant addition at 28° C were similar to observed at the ideal temperature of 35° C. These results can allow the use of this type of energy in regions which slightly lower temperatures, without costs with heating probes.

Keywords: codigestion; temperature; inoculant; biogas; methane

Graphical abstract



■ Room temperature ▨ Controlled temperature
 *** Represent the comparison of the trataments at diferent temperatures performed by Student's t test (p < 0.05).

- Legend:**
- IN_{F28°C} - Fed-inoculant acclimated at room temperature
 - IN_{NF28°C} - Non-fed inoculant fed acclimated at room temperature
 - Co_{28°C} - Biomaas (codigestion) at room temperature
 - IN_{F35°C} - Fed-Inoculant acclimated at 35°C
 - IN_{NF35°C} - Non-fed inoculant acclimated at 35°C
 - Co_{35°C} - Biomass (codigestion) at 35°C

5.1. Introduction

Increasing world population requires efficient agricultural practices. As agriculture progressed, food production expanded, and farm systems became more intensive (Tyczewska et al., 2018). Currently, the control of primary food production is carried out by an industrial branch called agribusiness, which contributes to the development and economy (FAO, 2017). However, despite bringing development, agriculture and agribusiness generate different types of wastes that are highly impacting on the environment when not properly managed (IPEA, 2012). Therefore, environmental agencies have raised concerns about the generation, destination and treatment of this type of waste.

Awareness of pollution, high environmental and economic costs of energy production, and sanitation issues increase the search for new renewable and sustainable energy sources (Hagos et al., 2017; De Oliveira and Negro, 2019). The high content of organic matter present in agricultural wastes turns these residues important for the development of the biogas chain (Scarlat et al., 2018; De Oliveira and Negro, 2019). Thus, between the 1970s and 1980s, the development of new technologies for biogas production using agricultural wastes as biomass enable its application in Europe and Brazil (Scarlat et al., 2018; De Oliveira and Negro, 2019). However, the absence of regulatory laws for the commercialization of this type of energy has resulted in inefficient projects (Theuerl et al., 2019).

Biogas is the result of anaerobic digestion of organic matter. The set of complex reactions performed by anaerobic microorganisms transforms the organic material into a gaseous mixture composed mainly of carbon dioxide (CO₂) and methane (CH₄). There are four stages of transformation of organic matter in biogas: hydrolysis, acidogenesis, acetogenesis and methanogenesis

(Schnürer, 2016). Each phase is performed by a different set of microorganisms, which works in syntrophy and requires specific environmental conditions. Control of biomass characteristics such as temperature, pH, total and volatile solids, and C/N ratio are essential for improving anaerobic digestion efficiency in bioreactors (Silva et al., 2017).

The physicochemical characteristics of biomass are highly related to the type of agricultural activities developed, and food producing regions have high potential to provide raw material (biomass) for anaerobic digestion (De Oliveira and Negro, 2019). However, mixing different organic wastes (known as anaerobic co-digestion - ACo) from different agribusiness activities improves the potential of these raw materials for biogas production (Siddique and Wahid, 2018), and solves biomass problems observed in the monodigestion (such as physicochemical characteristics of the substrate and system optimization). However, the use of ACo requires highly sophisticated technology to maintain biomass stability (Tufaner and Avşar, 2016; Hagos et al., 2017).

Southern Brazil has the potential to generate 1.3 million m³ day⁻¹ of biogas. This region generates approximately 82 million tons of biomass per year. Livestock is responsible for the most significant amount of biomass produced (cattle manure 62.5%, swine manure 19.7%, poultry 9.9%, sheep 2.8%, and horses 2.4%), followed by biomass from agro-industrial (2.4%) and winery (0.3%) origin (Konrad et al., 2016). Energy recovery from these wastes presents the potential for the development of biogas projects worldwide (De Oliveira and Negro, 2019). However, the temperate climate observed in the region may inhibit the proper functioning of the digesters and consequently the production of biogas, making the process inefficient. Temperature control in bioreactors is essential for

the success of the anaerobic digestion process, as some methanogenic microorganisms are sensitive to temperature changes (Westerholm et al., 2018).

There are three different temperature ranges that enable the development of methanogenic microorganisms: psychrophilic (10°C - 25°C), mesophilic (25°C - 40°C) and thermophilic (50°C - 55°C) (Goswami et al., 2016). Gas production rate improves with increasing temperature, but the percentage of methane, which should be kept high, decreases. Therefore, temperatures ranging from 32 to 35°C are considered ideal to achieve a more stable and continuous methane production (Liu et al., 2018). However, achieve and maintaining this temperature range are a problem in some regions of the world, where temperature variations throughout the year make heating probes necessary, which makes the economic viability of the process a challenge (Silva dos Santos et al., 2018).

The use of efficient inoculant (material previously incubated under anaerobic conditions - digestate) can improve the efficiency of biogas production. Inoculant aids improve biomass stability and, when acclimatized, may favor the development of specific microbial communities, which may improve the amount of biogas and methane produced (Dechrugsa et al., 2013; Lee et al., 2017). Thus, we hypothesized that the development and use of an efficient inoculant may improve biogas and methane production of biomass incubated at room temperature (below to ideal range) and subjected to daily variations. With this purpose, this work aimed to develop an efficient inoculant for improve biogas and methane production using an ACo from different organic residues generated by agribusiness activities as biomass. Inoculant preparation, microbial community structure and anaerobic digestion efficiency were evaluated with and without heating (constant mesophilic temperature and room temperature).

5.2. Material and Methods

The experiments were performed in two steps. The first was the preparation of the inoculant, followed by the identification of the microbial communities associated to this material. The second step was the evaluation of efficiency of previously prepared inoculant as initiator of the ACo process. Both experiments were performed at two temperatures: constant mesophilic range (35 °C – with heating) and room temperature (28 ± 3.5 °C – without heating).

5.2.1. Inoculant preparation

The raw material used to prepare the inoculants was a mixture of cattle (17%), swine (47%), and poultry (36%) manure in a final volume of 10 liters, according to the standard described by Konrad (2016) for Brazilian South region. These inoculants were incubated anaerobically for 72 days at constant (35 °C) or room (28 ± 3.5 °C) temperatures. Inoculants prepared at 35 °C remained in a biological incubator, and inoculants prepared at room temperature remained at room temperature (determined by sensor Novus Temp-WM).

At each temperature, two types of inoculants were prepared. One received 24 doses of four grams of volatile solids composed by gelatin (30%), microcrystalline cellulose (30%), lactose (25%) and cooking oil (15% - Steinmetz et al., 2016), and the second one did not receive the feed. The criteria used to initiate a feed (20th day) and end the anaerobic incubation process (52th day) was defined by the German standard VDI 4630, which considers that biomass is stabilized when the daily volume of biogas produced is less than 1% of the accumulated total for three consecutive days (Deutscher, 2006). At the end of the

incubation period, a 10 mL aliquot of each inoculant was collected to have the microbial community identified.

5.2.2. Physicochemical characterization of the inoculant

Inoculants were characterized by determination of total solids (TS), volatile solids (SV), pH, total carbon (C) and nitrogen (N). TS and VS were determined according to standard methods (APHA, 1998). The pH was measured using a pH electrode (DME-CV2). Total C and N were determined by the combustion method using a PerkinElmer® 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer.

5.2.3. Identification of microbial communities present in inoculants

An aliquot of each inoculant was used for DNA isolation using Power Soil DNeasy Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's specifications. A *16S rRNA* fragment gene was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) with F515/R806 primers and sequenced as described by Granada et al. (2018).

The *16S rRNA* reads generated by high-throughput sequencing were subjected to upstream analyses using QIIME v1.9 (Caporaso et al., 2010) as previously described by Granada et al. (2019). Operational taxonomic units (OTUs) were selected based on 97% sequence similarity and the taxonomic data was achieved through the classification algorithm using the Silva database version 132 (Gurevich et al. 2013). Sequencing results were deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under BioProject ID 000000.

5.2.4. Anaerobic digestion experiment – determination of inoculant efficiency

The Biomass used as codigestion for evaluate the efficiency of previously prepared inoculant on biogas production were composed by the same proportion of bovine, swine and poultry manure previously described (see item 2.1). The biogas and methane productions were evaluated in the presence and absence of inoculant, in the two evaluated temperatures. The proportion of inoculant and biomass used were established by VDI 4630, which determine that relation among VS from substrate and inoculant should not exceed 0.5 (Equation 1) and, total solids should not exceed 10% of total volume of reactor (Table 1) (Deutscher, 2006).

$$Eq. 1 \quad \frac{VS_{\text{substrate}}}{VS_{\text{inoculant}}} \leq 0.5$$

VS_{substrate} = volatile solids from ACo;

VS_{inoculant} = volatile solids from the inoculant.

The biogas production and methane content in biogas were evaluated in all treatments by automated biogas measurement system as described by Konrad et al. (2016). The methane percentage in biogas was measured by specific sensor Advanced Gasmitter, manufactured by PRONOVA Analysentechnik GmbH & Co.

5.2.5. Biochemical Biogas/Methane Potential

Biochemical biogas potential (BBP) and biochemical methane potential (BMP) were determined according to equation 2, and expressed as liters of biogas/methane per kilogram of volatile solid (L.kg_{vs}⁻¹), calculation based on Bioprocess Control Sweden AB (2013) .

$$\text{Eq. 2 } BBP/BMP = \frac{V_S - V_i \left(\frac{mVS_{is}}{mVS_i} \right)}{mVS_S}$$

V_S = accumulated volume of biogas/methane in inoculant + codigestion treatment;

V_i = accumulated volume of biogas/methane in inoculant treatment;

mVS_{is} = mass of volatile solids in inoculant + biomass treatment;

mSV_i = mass of volatile solids in inoculant treatment;

mSV_S = mass of volatile solids in codigestion treatment;

The percentage of O₂, N₂, CH₄, CO₂ and H₂S were determined at 20^o day of experiment by Gas Chromatography (GC), model Clarus 580 GC - ARNL5840 modified, brand PerkinElmer, using argon as the carrier gas. Gases are separated using two columns and then detected in thermal conductivity detector (TCD). The HayeSep column detect CO₂ and H₂S, and Molecular Sieve column detect O₂, N₂, CH₄ and CO. The determination of each gas percentage was performed in the software TotalChrom & Int LINK.

5.2.6. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicates. In each evaluated temperature, the results were compared by One-Way ANOVA with means compared by Tukey's test ($p < 0.01$) using InfoStat Statistical Software. The comparisons of the equal treatments in different temperatures were performed by Student's T test using PAST3 software.

A one-way ANOSIM and non-metric MDS tests were used to verify significant differences among the matrices generated by microbial relative abundance of the four inoculants evaluated. Significant differences were identified by the SIMPER test. ANOSIM, non-metric MDS and SIMPER tests were

performed at family and genus taxonomic levels. The nine microbial families that most contributed to dissimilarities (calculated by SIMPER test) and four parameters of biogas production (Methane yield, Biogas yield, $VS_{\text{Substrate}}$, C/N ratio) were chosen for a Canonical Correspondence Analysis (CCA) performed with the Past3 software.

5.3. Results and Discussion

5.3.1. Inoculant preparation and characterization

The experiments were carried out at constant temperature of 35° C (considered ideal temperature) and ~ 28° C (room temperature, highlight economic viability of the process). The feed with different carbon sources were performed aiming to select efficient methanogenic microbial communities. According to Steinmetz et al. (2016) the use of enriched and acclimatized inoculant improves the efficiency and stability of biogas production using different biomass sources and influence directly the development of the microbial communities. The inoculant preparation was monitored daily (Figure 1) and all inoculants presented methane percentage in biogas of approximately 60%. Fed-inoculants ($IN_{F35^{\circ}C}$ and $IN_{F28^{\circ}C}$) presented slightly increased biogas yield after 29 days of experiment (seventh feed) and remained stable until the last feed (day 52). At end of inoculant preparation, biogas yield in $IN_{F35^{\circ}C}$ was 19.97 $L_{\text{Biogas}} \cdot \text{kg}_{\text{Biomass}}^{-1}$, and in $IN_{F28^{\circ}C}$ was 7.14 $L_{\text{Biogas}} \cdot \text{kg}_{\text{Biomass}}^{-1}$. The non-fed inoculant incubated at 35°C ($IN_{NF35^{\circ}C}$) produced biogas only in first 10 days of experiment, and non-fed inoculant at 28°C ($IN_{NF28^{\circ}C}$) produced biogas only among the 28th to 38th days, and 65th to 72th days. The $IN_{NF35^{\circ}C}$ inoculant presented biogas yield of 3.41 $L_{\text{Biogas}} \cdot \text{kg}_{\text{Biomass}}^{-1}$, and $IN_{NF28^{\circ}C}$ presented 1.44 $L_{\text{Biogas}} \cdot \text{kg}_{\text{Biomass}}^{-1}$.

The inoculants were physicochemical characterized after 72 days of incubation (Table 2). At 28° C, fed-inoculant (IN_{F28°C}) presented high amount of volatile solids (grams) in comparison with non-fed inoculant (IN_{NF28°C}), and at 35° C fed and non-fed inoculants (IN_{F35°C} and IN_{NF35°C}) showed no significant differences. The codigestion used as biomass for evaluation of inoculants efficiency showed the highest amounts of volatile solids. The C/N ratio ranged from 8.4 in IN_{F28°C} to 12.9 in IN_{NF35°C}, however these differences not presented statistical differences. The control of biomass temperature, pH, total and volatile solids, and C / N ratio are essential to improve anaerobic digestion efficiency in bioreactors (Silva et al., 2017). The C/N of the fed and non-fed inoculants treatments showed no significant differences, maintaining values below the ideal range, which is among 20 to 30 (Xu et al., 2018). This relation highlights the high nitrogen content in evaluated inoculants. According to (Xu et al., 2018), any change in the C/N ratio on biomass may cause variations in dominant microbial domains, interfering in the development of methanogenic archaeal microorganisms. The study performed by Bi et al. (2020) showed that ammonia remotion in anaerobic digesters can decrease the propionate content and dissolved hydrogen, which contribute to the development of methanogens.

The high throughput sequencing generated a total of 486,276 sequences. After removing the low-quality sequences, 459,996 remained, with an average of 57,500 sequences for each evaluated treatment. Microbial communities presented important differences in fed and non-fed inoculants, and mainly in both temperatures (according to the non-metric MDS analysis - Figure 2), and these results highlight the importance of enrichment and acclimatization of the material. The Coordinate 1 explained 98.2% of total variability and this coordinate separate microbial communities present in 28° C to 35° C inoculants. SIMPER test

confirms these differences once the dissimilarity among inoculants acclimated at 28° C and 35° C was 49.7%.

Relative abundance of the genera *Caldicoprobacter* (~1.6% in 28° C inoculants and ~31.1% in 35° C inoculants), unclassified genus from *Rikenellaceae* family (~16.9% in 28° C inoculants and ~1.8% in 35° C inoculants) and unclassified genus from *Fastidiosipila* family (~18.8% in 28° C inoculants and ~8.9% in 35° C inoculants) were those that most contributed with these observed differences (responsible for 54.7% of dissimilarities). These most representative prokaryote identified have already been identified in biogas producing biomasses. Bacteria belong to *Caldicoprobacter* genus was already used in anaerobic digesters for degradation of lignocellulosic biomasses at mesophilic and thermophilic temperatures (Liu et al., 2018), and *Ruminococcaceae* present potential to produce longer chain fatty acids such as butyric, propionic lactic and valeric acid (Ferguson et al., 2018). These both microbial taxa were identified in high abundance in the inoculant acclimatized at 35° C. *Rikenellaceae* can use lactate as substrate in the fermentation process and produce acetate and propionate as final products (Su et al., 2013), and *Fastidiosipila* can be responsible for degradation of volatile fatty acids and proteins (Kim et al., 2018). These both taxa were identified in high abundance in the inoculant acclimatized at 28° C.

From the 29 identified microbial phyla, Firmicutes and Bacteroidetes were the most representative in all inoculants (Figure 3A). Bacteroidetes was the most representative in 28° C inoculants (~60% of total OTUs at 28°C and ~33% of total OTUs at 35° C), and Firmicutes at 35° C (~31% of total OTUs at 28° C and ~60% of total OTUs at 35° C). It is noteworthy that dominant microorganisms in the fed and non-fed inoculants at both tested temperatures 28°C and 35°C were the

hydrolytic and fermentative bacteria. The high abundance of these microorganisms can be due to their rapid growth and lower sensitivity to environmental changes (as pH and temperature - Venkiteshwaran et al., 2016). Firmicutes was the most abundant microbial phylum present in digestates which resulted of anaerobic digestion of swine and poultry manure at 38° C (Ziganshina et al. 2014). Clostridia class and *Bacteroidaceae* family were dominant fermenters in the anaerobic digester system present in wastewater treatment plant, and *Clostridium* genus played an important role in acetogenesis phase (Guo et al. 2015). The Phyla Proteobacteria, Actinobacteria, Tenericutes and Spirochaetes were considered less representative phyla (Figure 3B). There was identified only one classical methanogenic archaeal phyla Euryarchaeota (less than 0.5% of total identified OTUs in all evaluated inoculants).

According to the SIMPER test, at 28° C, fed and non-fed inoculants presented 16.3% of dissimilarities, and unclassified genus from *Rikenellaceae* family (~19.9% in fed, and ~13.9% in non-fed inoculant), Bacteroides (~6.7% in fed, and ~1.7% in non-fed inoculant) and unclassified genus from *Fastidiosipila* family (~16.4% in fed, and ~21.3% in non-fed inoculant) contributed with 49.1% of total. At 35° C, fed and non-fed inoculants presented 13.1% of dissimilarities, and unclassified genus from *Ruminococcaceae* family (~4.9% in fed, and ~1.6% in non-fed inoculant), *Fermentimonas* (~21.4% in fed, and ~21.0% in non-fed inoculant) and *Caldicoprobacter* (~32.4% in fed, and ~29.8% in non-fed inoculant) contributed with 36.3% of total (Table 3).

5.3.2. Efficiency of inoculants as starter of anaerobic digestion process

BBP and BMP are parameters that indicate the efficiency of conversion of organic matter in biogas and methane. Figure 4 shows the BBP and BMP in the

treatments during the incubation period. The methane percentages were similar in both temperatures (Figure 4A and B). At room temperature, the adding of fed and non-fed inoculants to biomass improve the biogas production during the first 35 days (Figure 4A). In this temperature, the biomass without inoculant achieve the highest methane percentage only after 55 days of experiment (the biomass delay to stabilize) the other treatments achieve the maximum methane percentage before the day 20. At 35° C, only the adding of fed-inoculant to biomass changed the pattern of biogas production (Figure 4B), the other treatments were similar in biogas and methane production. The composition analysis of the raw biogas on the 28th day showed that CH₄ and CO₂ were predominant in all treatments. The accumulated methane and biogas production highlight the biotechnological potential of fed and non-fed inoculants at room temperature (Figure 4C) and fed-inoculant at 35° C (Figure 4D). The inoculant was added to the treatments with the aim of maintain an adequate nutritional balance for microbial development at controlled and ambient temperatures. The increased production of biogas and methane observed in biomass with inoculants addition supports the suggestion of Koch et al. (2017) who found that methane production at a specific municipal wastewater treatment plant becomes efficient due to its high diversity of biomass, composed by carbohydrates, proteins, lipids and cellulose (mainly toilet paper).

Temperature control is essential factor for stability and performance of anaerobic digestion process (Lin et al., 2016; Westerholm et al., 2018; Liu et al., 2018), and more stable and continuous methane production were achieved when mesophilic temperature (32 to 35°C) is achieved (Liu et al., 2018). However, few studies have evaluated the performance of anaerobic digestion at slightly low temperatures (~ 28°C – Yu and Anderson 1996; Arikian et al 2015; Ramaraj and

Unpaprom 2016) and the influence of enriched and acclimated inoculant has not been reported. The addition of fed-inoculant at room temperature to biomass ($IN_{F28^{\circ}C}Co$) showed the highest BBP and BMP efficiency when compared to the non-fed inoculant addition ($IN_{NF28^{\circ}C}Co$) and only biomass ($Co_{28^{\circ}C}$). The conversion efficiency at 35° C did not present differences among all evaluated treatments (Table 4). The methane percentage of the biomass with both inoculants at room temperature was higher in comparison to biomass only, and at 35° C there was not differences in methane percentage in all evaluated treatments. Biomass without inoculant at room temperature ($Co_{28^{\circ}C}$) presented lower biogas and methane yield compared to other treatments.

The highest efficiency in biogas production occurs when methanogenic phase of microbial development is achieved (optimal temperature range of 32° to 35° C - Lianhua et al. 2010). Temperatures below 25° C can inhibit methanogenic activity (Wang et al., 2019). Thus, the delay in biomass stabilization observed in treatments without inoculants incubated at room temperature (28° C – see in green dotted line on Figure 4A) was not observed in treatments which were used inoculants (dark red and yellow dotted lines on Figure 4A). This delay was also observed in the preparation of inoculants (Figure 1) in which the maximum methane percentage was reached on the eighth day at 35° C and on the sixteenth day at 28° C. The low microbial growth rate at 28° C may have caused the delay to reach the methanogenic phase.

Canonical Correspondence Analysis (Figure 5) showed that fed-inoculant addition to biomass at room temperature ($IN_{F28^{\circ}C}$) was related to the biogas and methane yields from inoculant preparation. This treatment was also related to the unclassified genus from the family *Rikenellaceae* and unclassified genus from the family *Dysgonomonadaceae*. The addition of non-fed inoculant to biomass

($IN_{NF28^{\circ}C}$) was related to methane yield of inoculant and microbial genus *Campylobacter* and *Sedimentibacter*. At 35° C, fed and non-fed inoculants present similar results ($IN_{F35^{\circ}C}$ and $IN_{NF35^{\circ}C}$, respectively) and were related to biogas and methane yield of biomass in biogas experiment (codigestion), volatile solids from substrate ($VS_{Substrate}$) and C/N ratio. These treatments were also related to unclassified order from class *Clostridia*, *Caldicoproacter* and unclassified genus from the families *Lachnospiraceae* and *Ruminococcaceae*.

Differences in microbial communities observed in fed and non-fed inoculants did not influenced the PBB and PBM of the biomass in the presence of the inoculants. Thus, it was possible to identify that microbial adaptation to different temperatures favors the development of specific microorganisms, and changes in the community can occur without changes in biogas production (Ferguson et al., 2014). According to Lee et al. (2017), the use of inoculant with high microbial diversity can improve the efficiency of biogas production in bioreactors because the previously microbial adaptation performed in substrates. Koch et al. (2017) investigated different inoculants (a digester of a wastewater treatment plant, an agricultural biogas plant treating manure and energy crops and a biowaste treatment plant) and showed that biomass degradation was faster when adapted inoculant was used.

The results show that inoculant feeding and acclimation influenced the microbiological diversity of treatments and increased biogas production. The inoculant prepared at room temperature spent long time to start biogas production and showed greater instability during the incubation period. However, when added to the codigestion, fed and non-fed inoculants prepared at room temperature improve the conversion efficiency of organic matter in biogas and methane of the biomass. These data show that acclimated inoculant present a

specific microbiota for temperature, provide stability of anaerobic digestion process, and improve the efficiency of conversion of organic matter in biogas and methane.

5.4. Conclusions

Thus, the experiments performed in this work confirm our hypothesis. The use of inoculants (feed and non-feed) at 28° C improves the yield of biogas and methane, reaching similar values of ideal temperature range of 35° C. These promising results can enable the use of this type of energy production in regions which present slightly lower temperatures, without costs with heating probes on biodigester. It is necessary more studies to enable the use these technologies in different regions, however it is start point to search the sustainability of the agribusiness sector.

5.5. Acknowledgements

The authors would like to thank the University of Vale do Taquari (UNIVATES) and the Univates Technology and Scientific Park (TECNOVATES) for their collaboration and financial support during the development of this research. Also, to the Coordination of Superior Level Staff Improvement (CAPES) for the financial support and grant of scholarship. We thank High Performance Computing Lab - LAD/PUCRS for allowing access to run the high-throughput sequences analyses. Luiz Gustavo A. Borges thanks PEGA/PUCRS.

5.6. References

1. APHA, AWWA, WEF, 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. Washington DC, USA.
2. Arikan, O.A., Mulbry, W., Lansing, S., 2015. Effect of temperature on methane production from field-scale anaerobic digesters treating dairy manure. *Waste Manag.* 43, 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.06.005>
3. Bi, S., Qiao, W., Xiong, L., Mahdy, A., Wandera, S.M., Yin, D., Dong, R., 2020. Improved high solid anaerobic digestion of chicken manure by moderate in situ ammonia stripping and its relation to metabolic pathway. *Renew. Energy* 146, 2380–2389. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.093>
4. Bioprocess Control Sweden AB. AMPTS II, 2013. Automatic Methane Potential Test System. **Operation and Maintenance Manual**. V. 1.6.
5. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., 2011. Correspondence QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. *Nature Pub.* 7, 335–336. <https://doi.org/10.1038/nmeth0510-335>
6. De Oliveira, L.G.S., Negro, S.O., 2019. Contextual structures and interaction dynamics in the Brazilian Biogas Innovation System. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 602, 462-481. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.02.030>
7. Dechrugsa, S., Kantachote, D., Chaiprapat, S., 2013. Effects of inoculum to substrate ratio, substrate mix ratio and inoculum source on batch co-digestion of grass and pig manure. *Bioresour. Technol.* 816, 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.051>

8. Deutscher, V., 2006. Fermentation of organic materials Characterisation of the substrate, sampling, collection of material data, fermentation tests, VDI-Gesellschaft Energietechnik.
9. FAO, 2017. The State of Food and Agriculture: Leveraging Food Systems for Inclusive Rural Transformation, Population and Development Review. 161. <https://doi.org/10.2307/2938399>
10. Ferguson, R.M.W., Coulon, F., Villa, R., 2018. Understanding microbial ecology can help improve biogas production in AD. *Sci. Total Environ.* 1444, 754-763. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.007>
11. Ferguson, R.M.W., Villa, R., Coulon, F., 2014. Bioengineering options and strategies for the optimization of anaerobic digestion processes. *Environ. Technol.* 91, 1-14. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.907362>
12. Goswami, R., Chattopadhyay, P., Shome, A., Banerjee, S.N., Chakraborty, A.K., Mathew, A.K., Chaudhury, S., 2016. An overview of physico-chemical mechanisms of biogas production by microbial communities: A step towards sustainable waste management. *3 Biotech.* 72, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0395-9>
13. Granada, C.E., Vargas, L.K., Lisboa, B.B., et al., 2019. Bacterial and archaeal communities change with intensity of vegetation coverage in arenized soils from the pampa biome. *Front. Microbiol.* 10, 1–10. doi: [10.3389/fmicb.2019.00497](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00497)
14. Guo, J., Peng, Y., Ni, B.J., Han, X., Fan, L., Yuan, Z., 2015. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. *Microb. Cell Fact.* 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0218-4>

15. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G., 2013. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinf.* 29(8), 1072-1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
16. Hagos, K., Zong, J., Li, D., Liu, C., Lu, X., 2017. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 76, 1485–1496. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.184>
17. IPEA, 2012. Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA. 134.
18. Kim, E., Lee, J., Han, G., Hwang, S., 2018. Comprehensive analysis of microbial communities in full-scale mesophilic and thermophilic anaerobic digesters treating food waste-recycling wastewater. *Bioresour. Technol.* 476, 442-450. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.079>
19. Koch, K., Lippert, T., Drewes, J.E., 2017. The role of inoculum's origin on the methane yield of different substrates in biochemical methane potential (BMP) tests. *Bioresour. Technol.* 1264, 457-463. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.142>
20. Konrad, O., 2016. Atlas das biomassas do Rio Grande do Sul para produção de biogás e biometano. 1 ed. Univates, Lajeado. 226.
21. Konrad, O., Bezama, A.B., Prade, T., Backes, G.M., Oechsner, H., 2016. Enhancing the analytical capacity for biogas development in Brazil: assessment of an original measurement system for low biogas flow rates out of agricultural biomass residues. *Eng. Agrícola* 36, 792–798. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v36n5p792-798/2016>

22. Lee, J.T.E., He, J., Tong, Y.W., 2017. Acclimatization of a mixed-animal manure inoculum to the anaerobic digestion of *Axonopus compressus* reveals the putative importance of *Mesotoga infera* and *Methanosaeta concilii* as elucidated by DGGE and Illumina MiSeq. *Bioresour. Technol.* 245, 1148–1154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.123>
23. Lianhua, L., Dong, L., Yongming, S., et al. 2010. Effect of temperature and solid concentration on anaerobic digestion of rice straw in South China. *Int. J. Hydrogen Energ.* 35, 7261–7266. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.074>
24. Lin, Q., De Vrieze, J., He, G., Li, X., Li, J., 2016. Temperature regulates methane production through the function centralization of microbial community in anaerobic digestion. *Bioresour. Technol.* 216, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.046>
25. Liu, T., Sun, L., Müller, B., Schnürer, A., 2017. Importance of inoculum source and initial community structure for biogas production from agricultural substrates. *Bioresour. Technol.* 245, 768–777. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.213>
26. Liu, T., Sun, L., Nordberg, Å., Schnürer, A., 2018. Substrate-Induced Response in Biogas Process Performance and Microbial Community Relates Back to Inoculum Source. *Microorganisms.* 1-20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030080>
27. Ramaraj, R., Unpaprom, Y., 2016. Effect of temperature on the performance of biogas production from Duckweed. *Chem. Res. J.* 1, 58–66.
28. Scarlat, N., Dallemand, J.F., Fahl, F., 2018. Biogas: Developments and perspectives in Europe. *Renew. Energy.* 676, 457-472. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.006>

29. Schnürer, A., 2016. Biogas production: Microbiology and technology, in: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 195-234. https://doi.org/10.1007/10_2016_5
30. Siddique, M.N.I., Wahid, Z.A., 2018. Achievements and perspectives of anaerobic co-digestion: A review. *J. Clean. Prod.* 812, 359-371. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.05.155>
31. Silva, O.B. da, Carvalho, L.S., Almeida, G.C. da, Oliveira, J.D. de, Carmo, T.S., Parachin, N.S., 2017. Biogas - Turning Waste into Clean Energy, in: *Fermentation Processes*. 161-180. <https://doi.org/10.5772/64262>
32. Silva dos Santos, I.F., Braz Vieira, N.D., de Nóbrega, L.G.B., Barros, R.M., Tiago Filho, G.L., 2018. Assessment of potential biogas production from multiple organic wastes in Brazil: Impact on energy generation, use, and emissions abatement. *Resour. Conserv. Recycl.* 131, 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2017.12.012>
33. Steinmetz, R.L.R., Mezzari, M.P., da Silva, M.L.B., Kunz, A., do Amaral, A.C., Tápparo, D.C., Soares, H.M., 2016. Enrichment and acclimation of an anaerobic mesophilic microorganism's inoculum for standardization of BMP assays. *Bioresour. Technol.* 219, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.031>
34. Su, Y., Li, B., Zhu, W.Y., 2013. Fecal microbiota of piglets prefer utilizing dl-lactate mixture as compared to d-lactate and l-lactate in vitro. *Anaerobe*. 82, 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.006>
35. Theuerl, S., Herrmann, C., Heiermann, M., Grundmann, P., Landwehr, N., Kreidenweis, U., Prochnow, A., 2019. The future agricultural biogas plant in Germany: A vision. *Energies*. 396, 1-32. <https://doi.org/10.3390/en12030396>

36. Tufaner, F., Avşar, Y., 2016. Effects of co-substrate on biogas production from cattle manure: a review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2303-2312. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1069-1>
37. Tyczewska, A., Woźniak, E., Gracz, J., Kuczyński, J., Twardowski, T., 2018. Towards Food Security: Current State and Future Prospects of Agrobiotechnology. *Trends Biotechnol.* 1219-1229. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.008>
38. Venkiteshwaran, K., Bocher, B., Maki, J., Zitomer, D., 2016. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function. *Microbiol. insights.* 37-44. <https://doi.org/10.4137/MBI.S33593>
39. Wang, S., Ma, F., Ma, W., Wang, P., Zhao, G., Lu, X., 2019. Influence of temperature on biogas production efficiency and microbial community in a two-phase anaerobic digestion system. *Water (Switzerland).* 1-13. <https://doi.org/10.3390/w11010133>
40. Westerholm, M., Isaksson, S., Karlsson Lindsjö, O., Schnürer, A., 2018. Microbial community adaptability to altered temperature conditions determines the potential for process optimisation in biogas production. *Appl. Energy.* 1292, 838-848. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.06.045>
41. Xu, R., Zhang, K., Liu, P., Khan, A., Xiong, J., Tian, F., Li, X., 2018. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. *Bioresour. Technol.* 1262, 1119-1127. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.095>
42. Yu, H., Anderson, G. K., 1996.. Performance of a combined anaerobic reactor for municipal wastewater treatment at ambient temperature. *Res. Cons. Recyc.* 17(4), 259-271. [https://doi.org/10.1016/0921-3449\(96\)01101-9](https://doi.org/10.1016/0921-3449(96)01101-9)

43. Ziganshina, E.E., Belostotskiy, D.E., Shushlyayev, R. V., Miluykov, V.A., Vankov, P.Y., Ziganshin, A.M., 2014. Microbial community diversity in anaerobic reactors digesting turkey, chicken, and swine wastes. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14 <https://doi.org/10.4014/jmb.1404.04043>

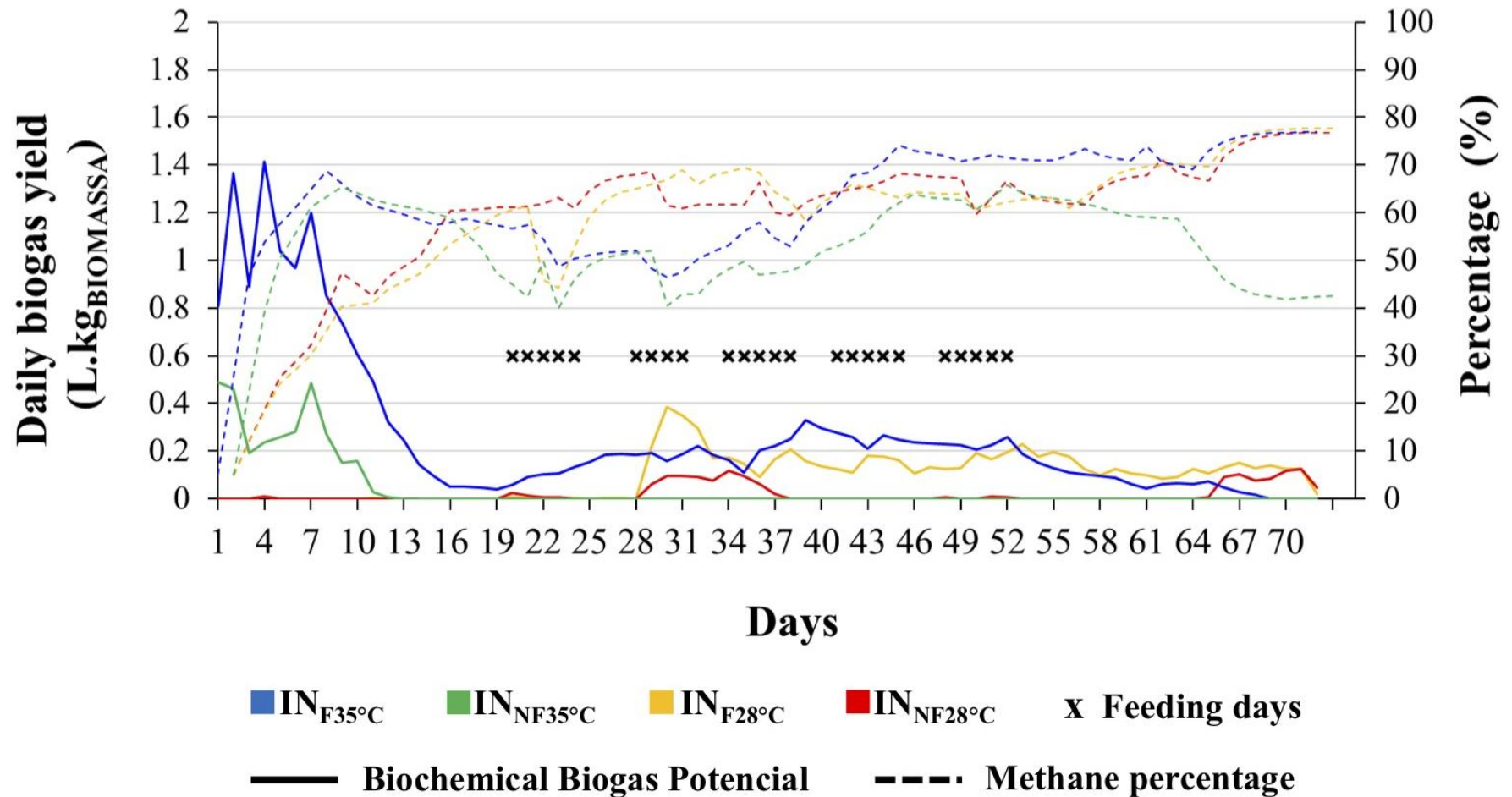


Figure 1: Pattern of biogas and methane production of the inoculants along 73 days of anaerobic incubation at room (28 ± 3.5 °C) and controlled (35 °C) temperatures. Biomass used in inoculant preparations was composed by a mixture of cattle (17%), swine (47%), and poultry (36%) manure. Two types of inoculants were prepared at each temperature: one received 24 doses of four grams of volatile solids composed by gelatin (30%), microcrystalline cellulose (30%), lactose (25%) and cooking oil (15% - IN_{F28°C} and IN_{F35°C}), and the second one did not receive the feed (IN_{NF28°C} and IN_{NF35°C}).

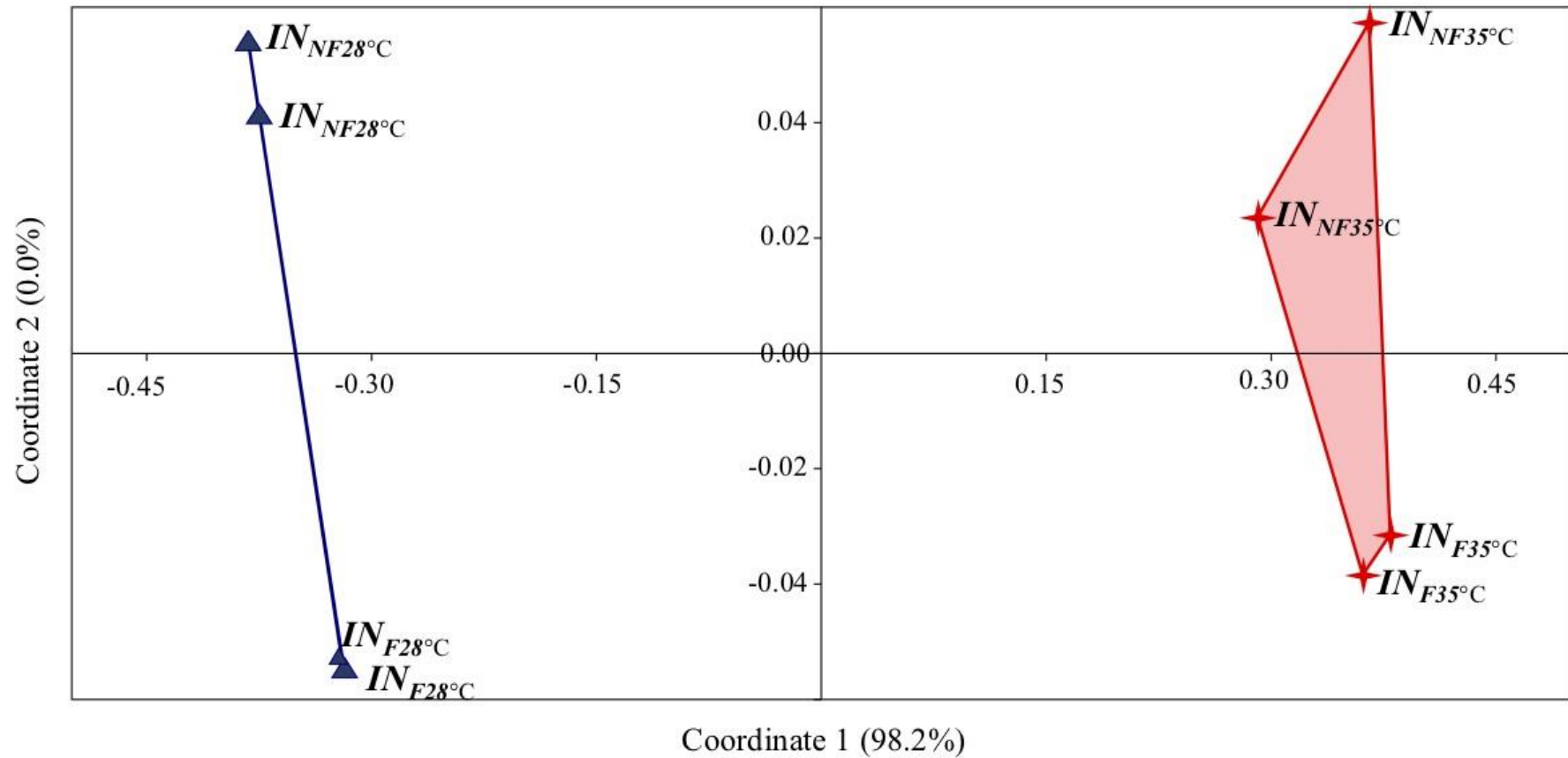


Figure 2: Non-metric MDS analysis of matrices generated by microbial relative abundance of *16S rRNA* reads obtained by high-throughput sequencing. Among the four inoculants evaluated, two received feed ($IN_{F28^{\circ}C}$ and $IN_{F35^{\circ}C}$) and two did not received feed ($IN_{NF28^{\circ}C}$ and $IN_{NF35^{\circ}C}$).

Composition of prokaryotic phyla

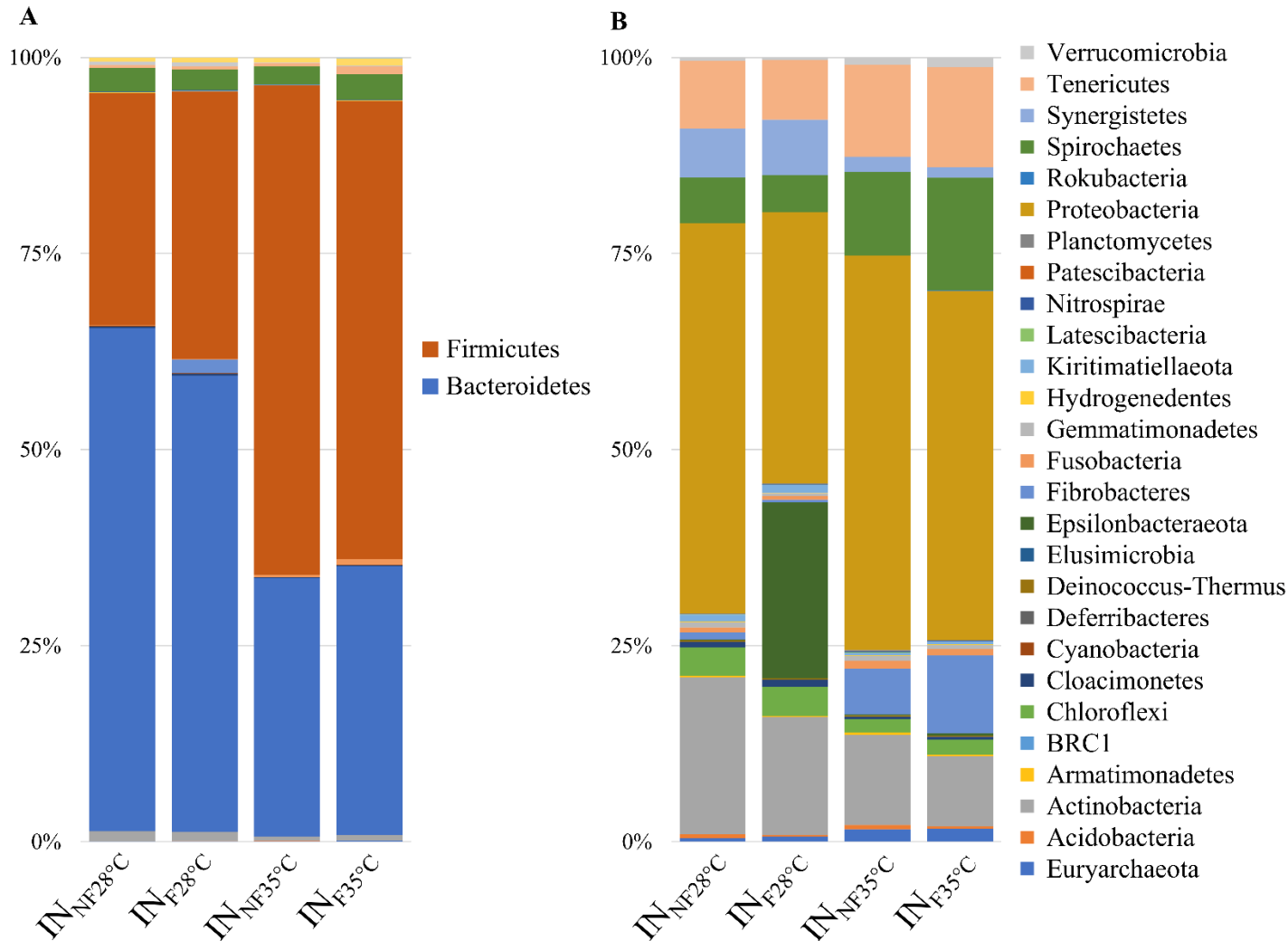
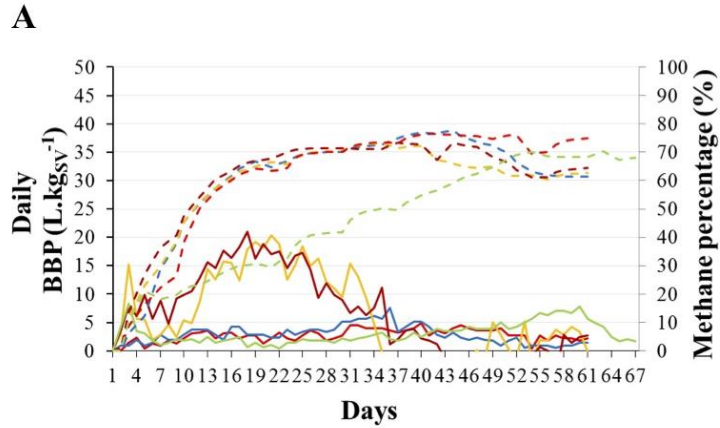
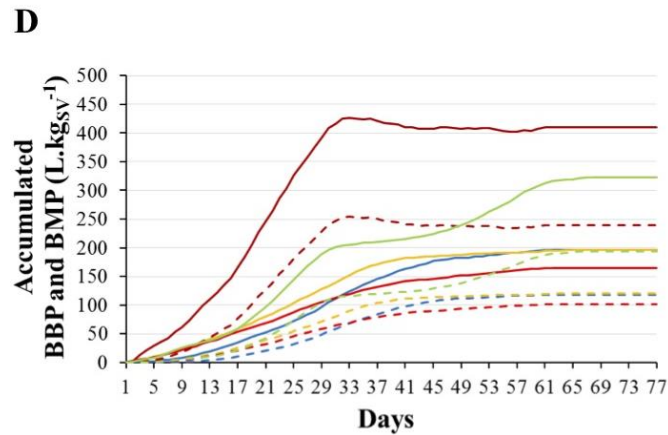
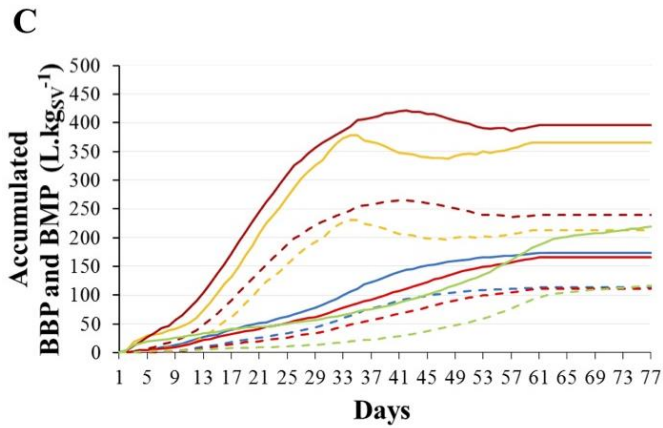
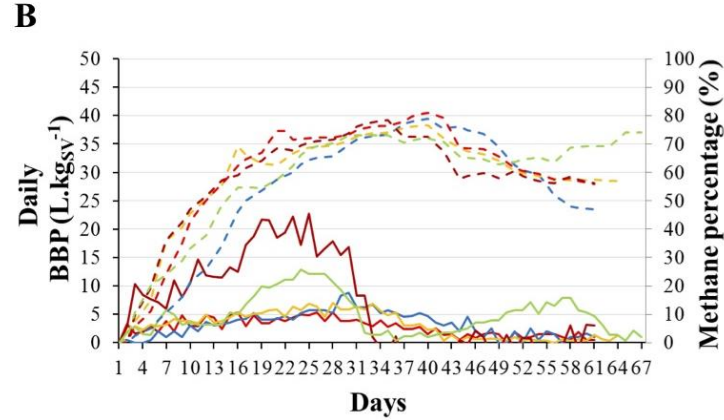


Figure 3: Relative abundance of taxa detected in the inoculants after 73 days of anaerobic incubation. (A) Total 29 identified microbial phyla; (B) Microbial phyla composition excluding the dominant taxa Firmicutes and Bacteroidetes.

Biogas production at 28±3.5°C



Biogas production at 35°C



■ In_F ■ In_{NF} ■ In_FCo ■ In_{NF}Co ■ Co — Biogas - - - Methane in Biogas

Figure 4: Anaerobic digestion experiment for determination of inoculant efficiency. The inoculants were added to codigestion and the biogas and methane productions were evaluated in the presence and absence of inoculant, at the two evaluated temperatures (28°C and 35°C). Biochemical Biogas / Methane Potential (BBP and BMP) and methane percentage were determined at 28°C (A and C) and at 35°C (B and D). In_F = feed inoculant, In_{NF} = non-feed inoculant, In_FCo = feed inoculant + codigestion, In_{NF}Co = non-feed inoculant + codigestion, Co = codigestion only.

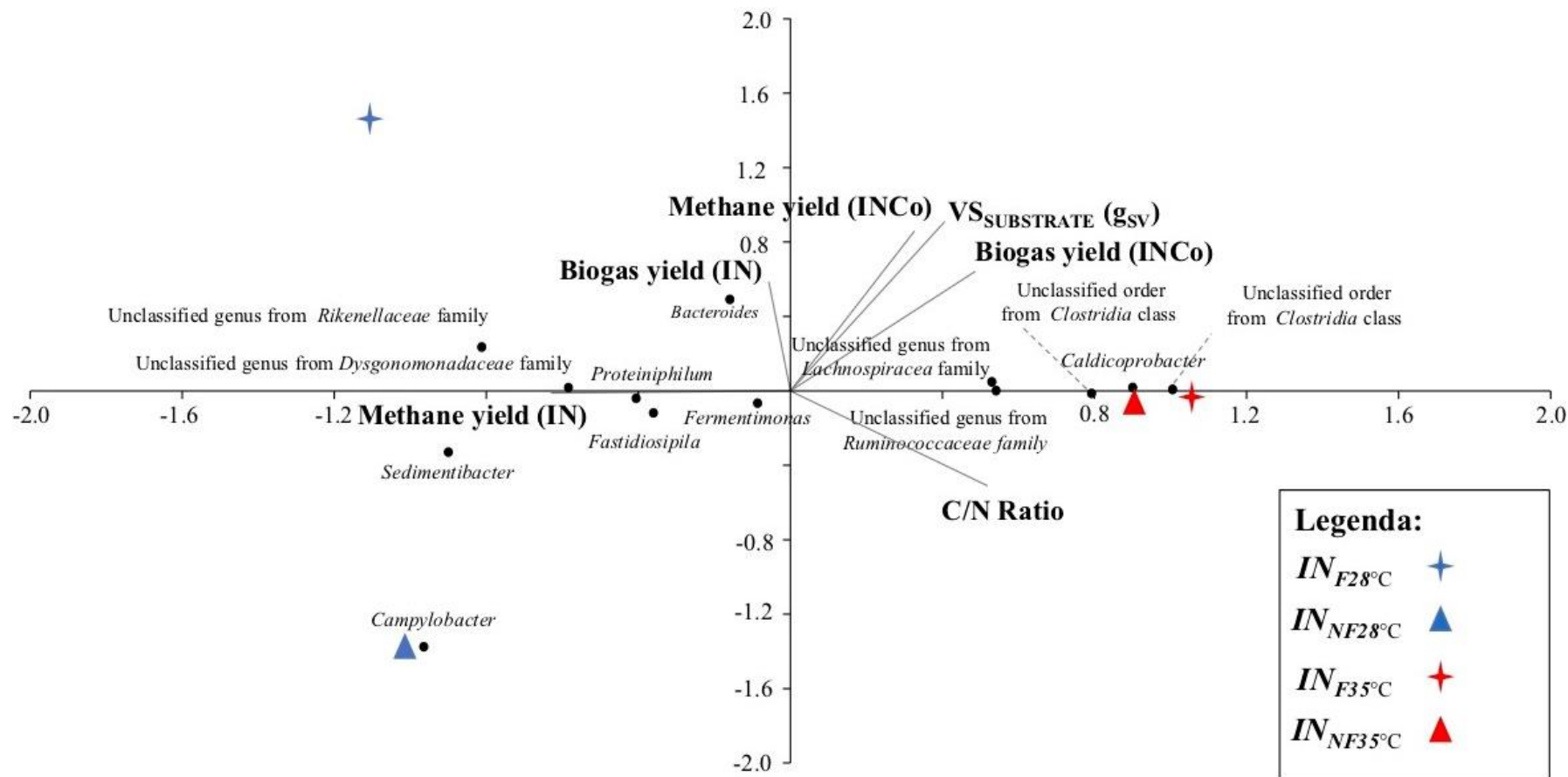


Figure 5: Canonical Correspondence Analysis (CCA) for the 13 OTUs that most contributed for total dissimilarity (calculated by SIMPER test) and five parameters of Biogas efficiency evaluated (Methane and biogas yields in inoculants, methane and biogas yields in the inoculant + codigestion experiment, volatile solids of the substrate and C/N ratio) in the four inoculants evaluated. IN_F = feed inoculant, IN_{NF} = non-feed inoculant.

Biogas composition (%)

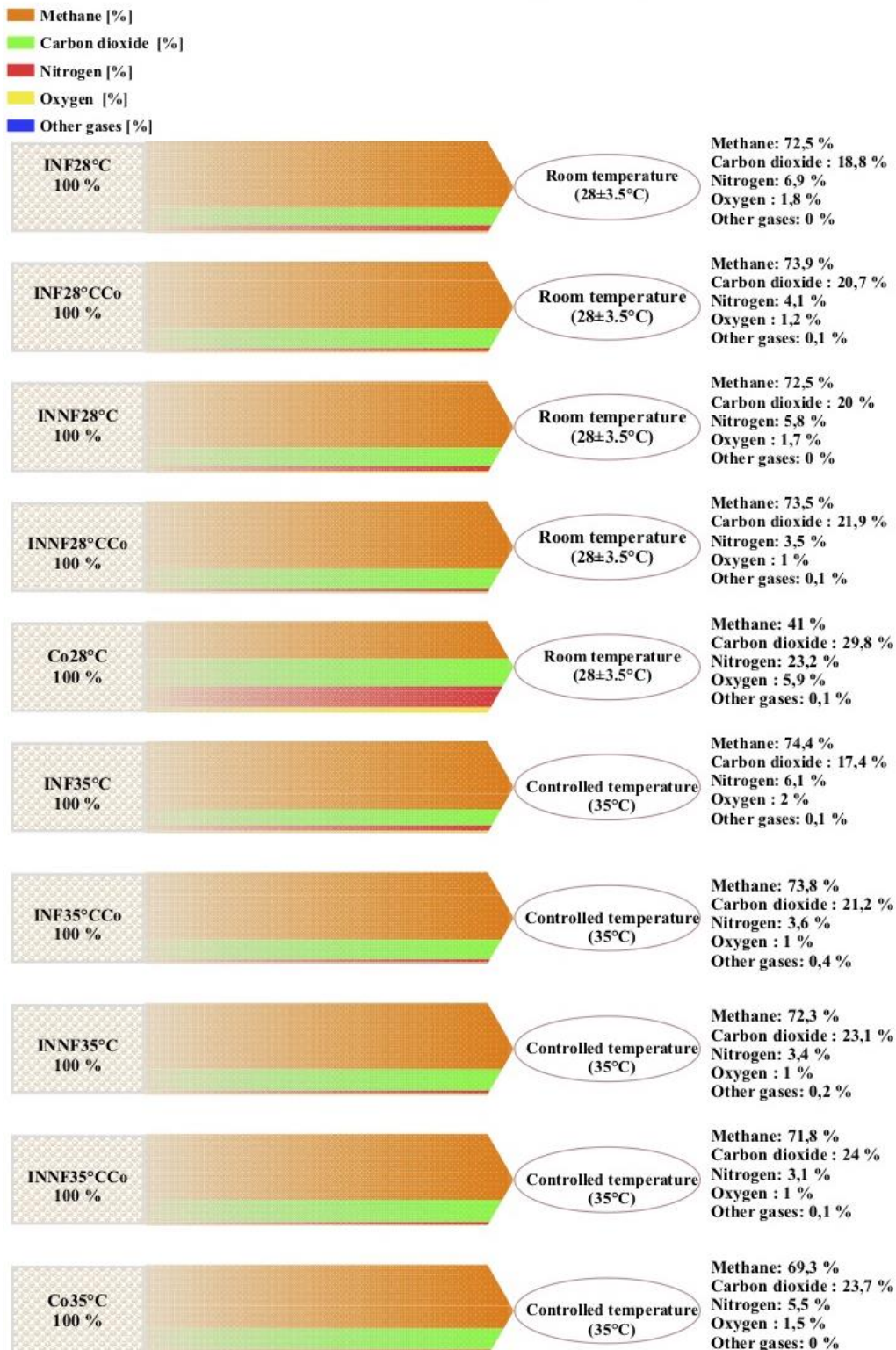


Figure S1: The percentage of O₂, N₂, CH₄, CO₂ and H₂S in the 20^o day of experiment. INF28°C = feed inoculant at 28°C, INF28°C Co = feed inoculant at 28°C + codigestion, INNF28°C = non-feed inoculant at 28°C, INNF28°C Co = non-feed inoculant at 28°C + codigestion, Co28°C = codigestion at 28°C, INF35°C = feed inoculant at 35°C, INF35°C Co = feed inoculant at 35°C + codigestion, INNF35°C = non-feed inoculant at 35°C, INNF35°C Co = feed inoculant at 35°C + codigestion, Co35°C = codigestion at 35°C.

Table 1: Biomass composition used in bioreactors. Proportion among inoculant and biomass (codigestion - Co).

Treatment	Inoculant (g)	Codigestion (g)	VS Inoculant (g)	VS Codigestion (g)	pH
	Room temperature (28±3.5°C)				
IN _{F28°C}	500.00	-	31.82 ± 0.38	--	7.89 ± 0.02
IN _{F28°C} Co	357.17	142.83	22.72 ± 0.27	11.37 ± 0.14	7.72 ± 0.01
IN _{NF28°C}	500.00	-	30.06 ± 0.16	--	7.89 ± 0.02
IN _{NF28°C} Co	362.91	137.09	21.82 ± 0.12	10.91 ± 0.13	7.8 ± 0.01
Co _{28°C}	-	500.00	--	39.79 ± 0.48	7.04 ± 0.05
Mesophilic temperature (35°C)					
IN _{F35°C}	500.00	-	29.91 ± 0.67	--	7.96 ± 0.02
IN _{F35°C} Co	363.42	136.58	21.46 ± 0.49	10.87 ± 0.44	7.78 ± 0.02
IN _{NF35°C}	500.00	-	27.76 ± 1.62	--	8.08 ± 0.01
IN _{NF35°C} Co	370.68	129.32	20.58 ± 1.20	10.29 ± 0.12	7.94 ± 0.03
Co _{35°C}	-	500.00	--	39.79 ± 1.63	7.00 ± 0.03

Inoculant fed and acclimated at room temperature (IN_{F28°C}); Inoculant fed and acclimated at room temperature and codigestion (IN_{F28°C}Co); Inoculant not fed and acclimated at room temperature (IN_{NF28°C}); Inoculant not fed and acclimated at room temperature and codigestion (IN_{NF28°C}Co); codigestion at 28° C (Co_{28°C}); Inoculant fed and acclimated at 35°C (IN_{F35°C}); Inoculant fed and acclimated at 35°C and codigestion (IN_{F35°C}Co); Inoculant not fed and acclimated at 35°C (IN_{NF35°C}); Inoculant not fed and acclimated at 35°C and codigestion (IN_{NF35°C}Co); codigestion at 35° C (Co_{35°C}).

Table 2: Evaluated parameters of inoculant used in the anaerobic digestion assay.

	TS (%)	VS (%)	VS_{Substrate} (g)	Carbon (%)	Nitrogen (%)	C/N Ratio
Codigestion (Co)	11.9±0.0	67.0±0.8	8.0±0.1	34.7±0.6	2.8±0.1	12.5±0.8
Room temperature (28±3.5°C)						
IN_{F28°C}	10.8±0.2 ^{aA}	58.8±1.0 ^{aA}	6.4±0.1 ^{aA}	31.3±2.4 ^{aA}	3.8±0.8 ^{aA}	8.4±2.4 ^{aA}
IN_{NF28°C}	10.6±0.1 ^{aA}	56.5±0.5 ^{bA}	6.0±0.0 ^{bA}	31.2±2.2 ^{aA}	2.9±0.2 ^{aA}	10.7±1.3 ^{aA}
Controlled temperature (35°C)						
IN_{F35°C}	10.1±0.2 ^{aA}	59.1±0.4 ^{aA}	6.0±0.1 ^{aA}	27.1±2.3 ^{aA}	2.8±0.7 ^{aA}	9.7±1.5 ^{aA}
IN_{NF35°C}	10.0±0.6 ^{aA}	55.4±1.1 ^{bA}	5.6±0.3 ^{aA}	28.2±1.9 ^{aA}	2.2±0.2 ^{aB}	12.9±1.5 ^{aA}

Fed-inoculant acclimated at room temperature (IN_{F28°C}); Non-fed inoculant acclimated at room temperature (IN_{NF28°C}); Fed-inoculant acclimated at 35°C (IN_{F35°C}); Non-fed inoculant acclimated at 35°C (IN_{NF35°C}). Results are expressed as means of three samples ± standard deviation. Small letters represent comparison among fed and non-fed inoculants at same temperature, and capital letters represent comparison among inoculant type at different temperatures both by Student's t test (p <0.05)

Table 3. Relative abundance of microorganisms that contributed most to the total dissimilarities of the treatments.

Phylum, class, order, family; genus	Cont (%)	IN _{F28°C}	IN _{NF28°C}	IN _{F35°C}	IN _{NF35°C}
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; <i>Caldicoprobacteraceae</i> ; <i>Caldicoprobacter</i>	26.75	1.94±0.09	1.20±0.19	32.42±1.37	29.85±3.63
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Rikenellaceae</i>	14.79	19.95±0.16	13.88±1.59	1.32±0.02	2.27±0.27
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i> ; <i>Fastidiosipila</i>	9.97	16.36±0.10	21.32±0.50	8.48±0.93	9.41±0.03
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Dysgonomonadaceae</i> ; <i>Fermentimonas</i>	5.51	22.65±0.48	27.42±0.77	21.39±2.29	21.02±4.47
Firmicutes; Clostridia	4.70	0.03±0.00	0.03±0.00	6.05±0.52	3.42±0.26
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Dysgonomonadaceae</i> ; <i>Proteiniphilum</i>	4.17	7.38±0.15	8.11±0.28	3.03±0.02	3.59±0.25
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Bacteroidaceae</i> ; <i>Bacteroides</i>	3.38	6.71±0.28	1.72±0.09	3.26±0.54	2.87±0.09
Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; <i>Dysgonomonadaceae</i>	2.80	4.20±0.30	4.12±0.10	0.94±0.19	1.28±0.12
Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; <i>Ruminococcaceae</i>	2.66	1.01± 0.05	1.08±0.05	4.88±0.90	1.57±0.13
Firmicutes; Clostridia	2.57	0.30±0.06	0.36±0.02	2.73±0.06	3.41±0.64

Cont = contribution; Fed-inoculant acclimated at room temperature (IN_{F28°C}); Non-fed inoculant acclimated at room temperature (IN_{NF28°C}); Fed-inoculant acclimated at 35°C (IN_{F35°C}); Non-fed inoculant acclimated at 35°C (IN_{NF35°C}). The percentage of microorganisms that contributed most to the total dissimilarity of the treatments performed by SIMPER test.

Table 4. Percentage of methane in biogas (CH₄), Biochemical biogas/methane potential (BBP and BMP) and biogas/methane yield in all evaluated treatments at end of biogas efficiency experiment.

	CH₄ (%)	BBP (L_{Biogas}·kg_{SV}⁻¹)	BMP (L_{Methane}·kg_{SV}⁻¹)	Biogas yield (L·kg_{Biomassa}⁻¹)	Methane yield (L·kg_{Biomassa}⁻¹)
Room temperature (28°±3.5)					
IN_{F28°C}	67±1 ^{aA}	166±15 ^{bA}	111±10 ^{bA}	11±1 ^{bA}	7±1 ^{bA}
IN_{F28°C}Co	64±2 ^{aA}	396±78 ^{aA}	240±40 ^{aA}	31±6 ^{aA}	19±3 ^{aA}
IN_{NF28°C}	66±1 ^{aA}	173±23 ^{bA}	114±17 ^{bA}	10±1 ^{bA}	7±1 ^{bA}
IN_{NF28°C}Co	62±1 ^{aA}	365±84 ^{aA}	213±50 ^{aA}	29±7 ^{aA}	17±4 ^{aA}
Co_{28°C}	53±4 ^{bA}	219±14 ^{bB}	117±14 ^{bB}	17±1 ^{bB}	9±1 ^{bB}
Controlled temperature (35°C)					
IN_{F35°C}	61±2 ^{aB}	164±7 ^{bA}	95±5 ^{bA}	10±0 ^{bA}	6±0 ^{bA}
IN_{F35°C}Co	60±2 ^{aA}	410±28 ^{aA}	240±16 ^{aA}	32±1 ^{aA}	19±1 ^{aA}
IN_{NF35°C}	61±1 ^{aB}	194±14 ^{bA}	118±10 ^{bA}	11±0 ^{bA}	7±0 ^{bA}
IN_{NF35°C}Co	61±1 ^{aA}	372±201 ^{aA}	230±119 ^{aA}	30±16 ^{aA}	18±9 ^{aA}
Co_{35°C}	60±1 ^{aA}	329±16 ^{aA}	199±10 ^{aA}	26±0 ^{aA}	15±0 ^{aB}

Fed-inoculant acclimated at room temperature (IN_{F28°C}); Non-fed inoculant fed acclimated at room temperature (IN_{NF28°C}); Biomass (codigestion) at room temperature (Co_{28°C}); Fed-Inoculant acclimated at 35°C (IN_{F35°C}); Non-fed inoculant acclimated at 35°C (IN_{NF35°C}); Biomass (codigestion) at 35°C (Co_{35°C}). Values are the means of three samples ± standard deviation. Variance analysis was performed by one-way ANOVA and small letters represent differences according to the Scott & Knott test (p <0.05). Capital letters represent the comparison of the inoculants at different temperatures performed by Student's t test (p <0.05).

5 CAPÍTULO II

**Isolamento de microrganismos para formulação de um inoculante
visando acelerar a degradação de resíduos orgânicos agrícolas em
biodigestores**

6.1 Objetivo

Formular um inoculante com uma mistura de microrganismos isolados de inoculantes aclimatados em temperatura ambiente ($28\pm 3,5$ °C) e controlada (35 °C) para acelerar a conversão da matéria orgânica de resíduos agrícola em biogás e metano.

6.2 Materiais e métodos

O desenvolvimento deste estudo é a sequência do capítulo I. A partir dos inoculantes preparados na etapa I foram isolados microrganismos que estão sendo testados quanto ao seu potencial de aceleração de auxílio na conversão da matéria orgânica de resíduos agrícola em biogás.

6.2.1. Isolamento de microrganismos

Uma alíquota de 100 μ L dos inoculantes aclimatados foram inoculadas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura semi-sólido ágar Triptona de Soja (TSA) e incubados em jarras de anaerobiose nas temperaturas controlada e ambiente para fazer uma pré-seleção de microrganismos. Após o crescimento bacteriano uma alíquota foi inoculada pela técnica de esgotamento em meio Ágar Reasoner's 2A (R2A) em placas de petri e novamente incubada em jarras de anaerobiose nas temperaturas adequadas. As colônias bacterianas com diferentes características morfológicas foram isoladas do ágar R2A foram purificadas e preservadas em glicerol - 20° C.

6.2.2. Identificação dos microrganismos isolados

O DNA genômico dos microrganismos isolados foram extraídos pela técnica descrita por Sambrook e Russell (2001) que, utiliza fenol clorofórmio para purificação do DNA. Para amplificação do gene *16S rRNA* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores BacpaeF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e Bac1542R (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'). As reações foram compostas por: 50 ng de DNA genômico, 0,1 mmol L⁻¹ MgCl₂, 10 μmol.L⁻¹ de cada dNTP, 0,3 μmol.L⁻¹ de cada oligonucleídeos iniciadores e 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen®), totalizando um volume de 25 μL. Estas reações foram submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1,5 minutos e para a extensão final a 72°C por 7 minutos, conforme descrito por Bates et al. (2011). Por fim, os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) e brometo de etídeo e visualizados por luz UV. Os fragmentos foram sequenciados em um laboratório parceiro e as sequências obtidas foram analisadas e comparadas às sequências depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) para identificação dos isolados.

6.2.3. Ensaio de digestão anaeróbia

Os microrganismos isolados foram inoculados separadamente em 50 mL do Caldo Triptona de Soja (TSB) e incubados a 28 °C durante 48h. Após atingir uma contagem superior a 10⁹ ufc.mL⁻¹, 100 mL do caldo bacteriano foi centrifugado e ressuspenso em 5 mL de solução de salina (NaCl 0,85 %). As soluções contendo os dez microrganismos foram misturadas e o *pool* dos isolados bacterianos (50 mL)

foi inoculado em reatores com 500 g de co-digestão anaeróbia (dejeito bovino, suíno e aves, mesma biomassa utilizada no estudo do Capítulo I). Os reatores com somente a co-digestão e co-digestão com microrganismos foram submetidos ao ensaio de digestão anaeróbia para avaliar a eficiência dos microrganismos isolados na degradação da matéria orgânica e produção de biogás.

O experimento foi realizado em triplicatas e avaliado em temperatura controlada e ambiente. As triplicatas foram compostas por: Co-digestão em temperatura controlada (Co_{35°C}), Co-digestão em temperatura controlada e bactérias isoladas (Co_{35°C}Bac), Co-digestão em temperatura ambiente (Co_{28°C}) e Co-digestão em temperatura ambiente e bactérias isoladas (Co_{28°C}Bac). As triplicatas somente com Co-digestão (Co_{35°C} e Co_{28°C}) foram mantidas como triplicatas controle.

O ensaio de digestão anaeróbia e caracterização da Co-digestão foi realizado no Centro de Pesquisa em Energias e Tecnologias (CPETS) da Univates. A quantificação da produção de biogás foi realizada no Sistema Automatizado de Medição de Biogás (SAMB), conforme descrito por Konrad et al. (2016). A qualificação do biogás obtido foi realizada por um sensor específico de medição de metano, denominado Advanced Gasmitter, produzido pela empresa PRONOVA Analysentechnik GmbH & Co e por Cromatografia Gasosa (GC), modelo Clarus 580 GC - ARNL5840 modificado, marca PerkinElmer.

A caracterização da co-digestão foi realizada por análises de sólidos totais e voláteis, por método gravimétrico de acordo com Standard Methods (APHA, 1998) e pH pelo método potenciométrico com pHmetro da marca DIGIMED (DME-CV2).

6.3. Resultados e discussão

6.3.1 Isolamento e identificação de microrganismos

Dez bactérias com diferentes morfologias coloniais e com crescimento rápido foram selecionadas (TABELA 1).

Tabela 1 - Identificação das bactérias isoladas dos inoculantes aclimatados.

Filo, classe, ordem, família, gênero	% de similaridade*
1 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Paenibacillaceae</i> , <i>Paenibacillus</i> sp.	98,94
2 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Bacillaceae</i> , <i>Lysinibacillus</i> sp.	99,98
3 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Bacillaceae</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bacillus</i> sp.	99,60
4 Não identificado	-
5 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Bacillaceae</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Bacillus</i> sp.	99,00
6 Não identificado	-
7 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Bacillaceae</i> , <i>Lysinibacillus</i> sp.	99,00
8 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Bacillaceae</i> , <i>Lysinibacillus</i> sp.	100,00
9 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Bacillaceae</i> , <i>Lysinibacillus</i> sp.	99,00
10 Firmicutes, Bacilli, Bacillales, <i>Bacillaceae</i> , <i>Lysinibacillus</i> sp.	99,00

*Similaridade observada pelo banco de dados GenBank

Todas as bactérias identificadas são do filo Firmicutes, sete são da família *Bacillaceae* e uma da família *Paenibacillaceae*. Estes microrganismos foram isolados do digestato, material de saída do processo de biodigestão dos inoculantes. Segundo Chen, et al. (2016), Firmicutes dominam a comunidade bacteriana durante o desempenho estável do processo, ou seja, na presença de baixa taxa de carregamento orgânico. Sua função em reatores anaeróbios, é fundamental para a fermentação de ácidos graxos voláteis simples, principalmente na produção de ácido acético, uma etapa essencial para a produção de metano por microrganismos metanogênicos acetoclásticos.

A abundante representatividade do filo Firmicutes em reatores anaeróbios com diferentes biomassas (resíduos alimentícios; esterco bovino e palha; esterco bovino, suíno com silagem de milho e grãos alimentados consecutivamente com caseína, amido e creme; esterco de galinha combinado com esterco bovino, somente estrume bovino ou em combinação com palha de milho ou grãos de destilaria e torta de *Jatropha*; esterco bovino e soro de leite) e em diferentes temperaturas (sistemas mesofílicos e termofílicos) já foi relatado por YI et al. (2014); SUN et al. (2015), ZIGANSHIN et al. (2013), LI et al. (2015).

6.3.2. Ensaio de digestão anaeróbia

Um mililitro da solução do *pool* de microrganismos isolados foi inoculada na co-digestão para avaliar sua influência na produção de biogás. A quantidade de co-digestão (dejeito bovino, suíno e aves) adicionada nos reatores, sólidos totais, voláteis e pH para iniciar o experimento foram iguais em todos os tratamentos.

Os sólidos totais e voláteis da co-digestão foram $16,52 \pm 0,40$ % e $61,97 \pm 0,86$ %, respectivamente. Considerando os percentuais de sólidos e a quantidade de co-digestão adicionada (500 g) no reator, obteve-se um valor de $51,19 \pm 0,00$ gramas de sólidos voláteis (gSV) em cada reator. Estes valores mostram o potencial da co-digestão para produção de biogás, devido ao percentual de sólidos voláteis acima de 60%. Os sólidos voláteis são a fração da biomassa que representa a matéria orgânica capaz de ser biodegradada e convertida em biogás, portanto quanto maior sua representatividade na parcela seca de matéria orgânica, melhor é a eficiência de conversão da biomassa em biogás (HASAN et al., 2019).

O pH da co-digestão foi de $7,80 \pm 0,05$, faixa neutra a levemente alcalino (6,3 a 7,9), o que é ideal para microrganismos metanogênicos (GUERI; SOUZA; KUCZMAN, 2018).

Os volumes de biogás gerados dos tratamentos: Co-digestão em temperatura controlada (Co_{35°C}), Co-digestão em temperatura controlada e bactérias isoladas (Co_{35°C}Bac), Co-digestão em temperatura ambiente (Co_{28°C}) e Co-digestão em temperatura ambiente e bactérias isoladas (Co_{28°C}Bac), estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Produção de biogás e metano da co-digestão e da co-digestão com o pool de bactérias isoladas na temperatura ambiente e controlada.

	CH₄ acumulado (%)	Volume de Biogás (L-Biogás)	Volume de Metano (L-Metano)
Temperatura controlada (35°)			
Co_{35°C}	$55,97 \pm 1,58^{aA}$	$8,5 \pm 3,78^{aA}$	$4,8 \pm 3,18^{aA}$
Co_{35°C}Bac	$56,96 \pm 0,92^{aA}$	$11,0 \pm 0,58^{aA}$	$6,3 \pm 0,24^{aA}$
Temperatura ambiente (28°C ± 8,46)			
Co_{28°C}	$48,09 \pm 5,16^{aA}$	$3,7 \pm 0,59^{aA}$	$1,8 \pm 0,39^{aA}$
Co_{28°C}Bac	$44,31 \pm 4,32^{aB}$	$3,9 \pm 0,17^{aB}$	$0,7 \pm 0,10^{aB}$

Co-digestão em temperatura controlada (Co_{35°C}); Co-digestão em temperatura controlada e bactérias isoladas (Co_{35°C}Bac); Co-digestão em temperatura ambiente (Co_{28°C}); Co-digestão em temperatura ambiente e bactérias isoladas (Co_{28°C}Bac). Os valores são a média de três amostras ± desvio padrão. A análise de variância foi realizada por ANOVA one-way de acordo com Scott & Knott test ($p < 0,05$), onde letras minúsculas representam a comparação da co-digestão com e sem bactérias isoladas na mesma temperatura e letras maiúsculas representam a comparação entre o tipo de co-digestão em diferentes temperaturas, pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

Na Figura 1A destaca-se o alto teor de metano (aproximadamente 75%) nos quatro tratamentos e a elevada produção diária de biogás no 54º dia (fase exponencial), isso indica que o material não foi totalmente degradado e ainda

apresenta disponibilidade de matéria orgânica para ser convertida em biogás. No entanto, a Figura 1B mostra a produção acumulada de biogás e metano dos tratamentos em temperatura controlada (Co_{35°C} e Co_{35°C}Bac) e ambiente (Co_{28°C} e Co_{28°C}Bac), os resultados indicam que a adição do *pool* de bactérias não melhorou a produção de biogás nas diferentes temperaturas.

De acordo com o estudo realizado por Hasan et al. (2019), que avaliou a variação do percentual de dejetos suíno em uma mistura com lodos de estações de tratamento de efluentes de frigoríficos e laticínio e sangue animal (suíno e aves), a co-digestão com presença de 40% e 50% de dejetos suíno, valores intermediários ao percentual de dejetos suíno utilizado neste estudo (47%), produziu 12,52 e 12,37 L de biogás e 8,39 e 8,18 L de metano, valores próximos aos encontrados na Co_{35°C}Bac, mesmo apresentando biomassas diferentes.

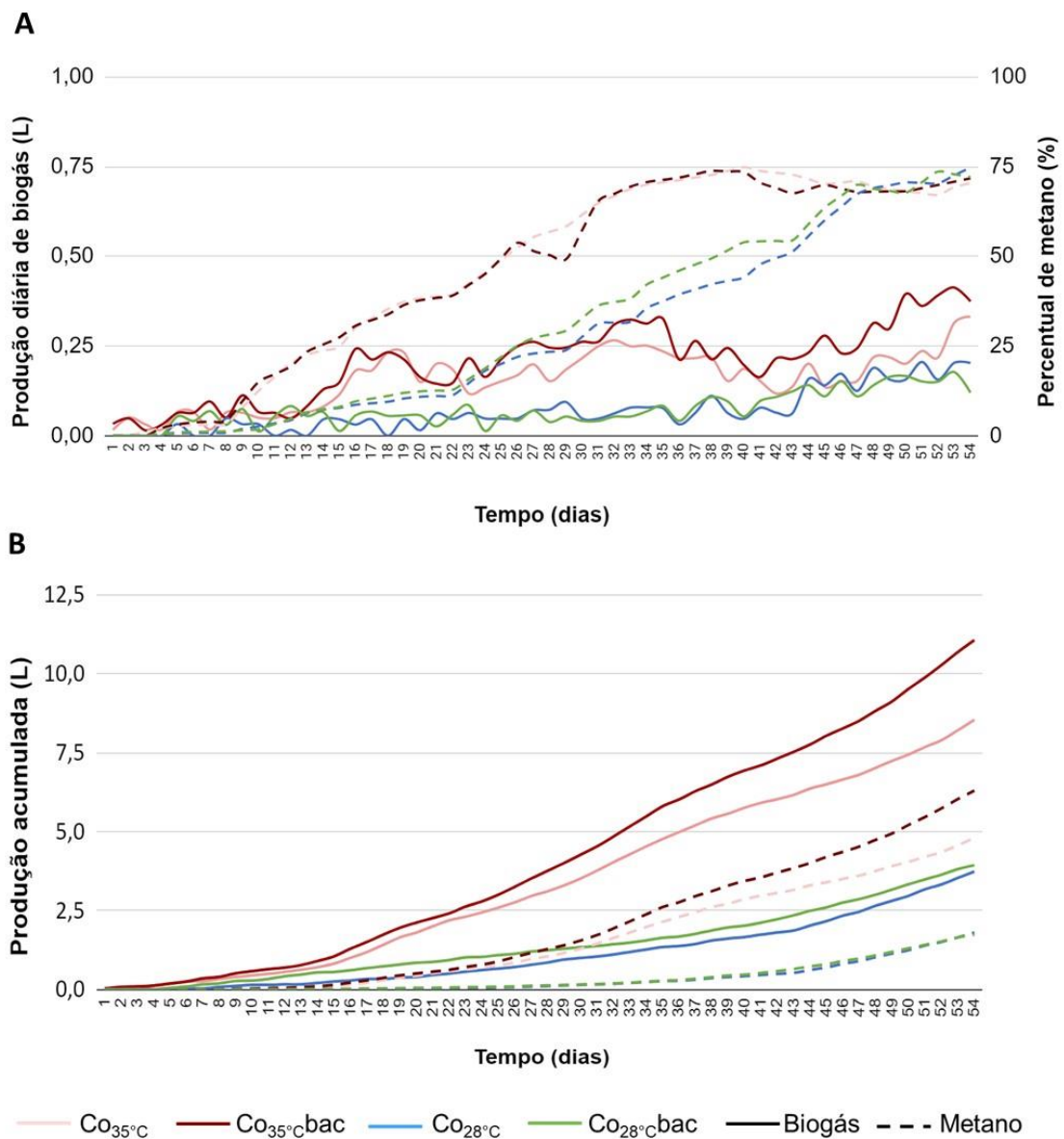


Figura 1 - Produção diária (A) e acumulada (B) dos tratamentos ao longo de 54 dias de incubação anaeróbica em temperatura ambiente ($28 \pm 8,46 \text{ }^\circ\text{C}$) e temperatura controlada ($35 \text{ }^\circ\text{C}$). A co-digestão usada foi composta por uma mistura de dejetos de gado (17%), suíno (47%) e aves (36%). Os tratamentos avaliados foram: Co-digestão em temperatura controlada (Co_{35°C}), Co-digestão em temperatura controlada e bactérias isoladas (Co_{35°C}Bac), Co-digestão em temperatura ambiente (Co_{28°C}) e Co-digestão em temperatura ambiente e bactérias isoladas (Co_{28°C}Bac).

Considerando que os tratamentos se encontram na fase exponencial de produção de biogás (FIGURA 1) e que a quantidade de gramas de sólidos voláteis

(gSV) disponíveis para serem degradadas é mais que o dobro (51,19 gSV) das encontrados por Hasan et al. (2019) (20,7 e 19,4 gSV) para 40% e 50% de dejetos suíno, entende-se que ainda há potencial para aumentar a produção de biogás e metano.

6.4. Perspectivas

Para completar o Capítulo II, será avaliado o pool de bactérias isoladas em um sistema de digestão anaeróbia com amostra padrão (Celulose Microcristalina), pois esta possui potencial bioquímico de biogás conhecido. Acredita-se que com estes resultados podem mostrar a influência destes microrganismos na digestão anaeróbia, visto que a celulose microcristalina é um substrato de fácil assimilação para os microrganismos.

6 DISCUSSÃO GERAL

Esta pesquisa foi desenvolvida com o intuito de elaborar um inoculante com potencial de acelerar a degradação anaeróbia de uma co-digestão com dejetos animais (bovino, suíno e aves), potencializando a produção de biogás, e avaliar a utilização de temperatura ambiente em biodigestores. Esta pesquisa também visou isolar microrganismos e montar um inoculante com os mesmos.

A pesquisa foi desafiadora, pois poucos estudos realizam avaliações em temperaturas menores que a ideal para o crescimento de microrganismos anaeróbios (35 °C). A maioria dos estudos, buscam avaliar temperaturas mesófilas (35 °C) ou termófilas (55°C). Portanto, devido a necessidade de encontrar alternativas para minimizar custos operacionais com biodigestores, este estudo buscou trabalhar com temperatura ambiente, sem um devido controle, e como resultado verificou-se que é possível utilizar temperatura ligeiramente inferior a considerada ideal ($28 \pm 3,5^{\circ}\text{C}$).

No Capítulo I, o estudo desenvolvido em duas etapas: preparo dos inoculantes e avaliação destes em sistema de co-digestão anaeróbia, mostrou que os microrganismos se adaptam a condições ambientais pré-estabelecidas. Avaliação dos inoculantes em sistema de co-digestão anaeróbia, mostrou que o rendimento de

biogás da co-digestão com inoculantes na temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3,5$) não apresentou diferença significativa dos valores obtidos na temperatura ideal de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, indicando que temperaturas menores da faixa ideal podem ser utilizadas, desde que se respeite o tempo de adaptação dos microrganismos no ambiente estabelecido.

A análise da composição da microbiota dos inoculantes após aclimação mostrou maior representatividade de microrganismos do filo Firmicutes e Bacteroidetes, sendo Firmicutes o filo com maior representatividade na temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ e Bacteroidetes com maior representatividade na temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Esta maior representatividade confirma a relevância das etapas iniciais do processo de degradação da matéria orgânica (hidrólise e fermentação), na qual estes microrganismos disponibilizam os substratos de interesse dos microrganismos acidogênicos e metanogênicos para produção de metano.

A etapa de avaliação dos inoculantes com a co-digestão anaeróbia confirmou a importância dos inoculantes na inicialização e melhora da produção de biogás, este resultado confirma a hipótese desenvolvida no início do projeto de pesquisa.

O capítulo II, é a continuidade deste projeto de pesquisa, nesta etapa as bactérias isoladas foram aplicadas em sistema de co-digestão anaeróbia para avaliação do seu potencial de produção de biogás. Este experimento encontra-se em andamento e ainda apresenta somente resultados preliminares.

Considerando os resultados obtidos neste estudo, entende-se ser interessante avaliar a microbiota da co-digestão com inoculante em diferentes períodos e nas temperaturas ambiente e controlada ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$) para identificar o desenvolvimento dos microrganismos, obtendo dados mais completos do sistema de digestão anaeróbia durante o período de incubação.

7 CONCLUSÕES

Inoculantes eficientes para acelerar o processo de degradação da matéria orgânica de uma co-digestão com dejetos bovinos, suínos e aves, foram preparados e avaliados em sistema anaeróbio quanto ao seu potencial na melhoria da produção de biogás e metano. As avaliações foram realizadas em temperatura controlada (35 °C) e ambiente ($28 \pm 3,5$ °C) para visualizar alternativas de minimizar custos operacionais de biodigestores.

A identificação dos microrganismos presentes nos inoculantes previamente preparados confirmou que a representatividade de microrganismos é diferente nos inoculantes em temperatura controlada (35 °C) e ambiente ($28 \pm 3,5$ °C). Firmicutes apresentam maior representatividade em temperatura controlada (35 °C) e Bacteroidetes em temperatura ambiente ($28 \pm 3,5$ °C).

A avaliação do potencial dos inoculantes previamente preparados para melhorar a produção de biogás mostrou que os inoculantes (alimentados e não alimentados) a 28 °C fizeram com que o rendimento de biogás e metano fosse semelhante aos valores encontrados na faixa ideal de temperatura de 35 °C.

O estudo também confirmou que os microrganismos isolados não potencializaram a produção de biogás nas temperaturas controlada (35 °C) e ambiente

($28 \pm 3,5$ °C). Portanto, novos testes devem ser realizados com biomassa conhecida para obter um resultado ainda mais seguro.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam que o uso de inoculante previamente preparado pode melhorar a eficiência da produção de biogás em temperatura controlada (35 °C) e ambiente ($28 \pm 3,5$ °C), devido à adaptação microbiana anteriormente realizada com substratos, e confirma que mudanças na comunidade microbiana podem ocorrer sem alterações na produção de biogás, ou seja, diferentes grupos microbianos desempenham as mesmas funções em diferentes condições operacionais.

O principal destaque do trabalho foi a avaliação de diferentes temperaturas nos sistemas de biodigestão anaeróbia. Os resultados mostraram que o potencial bioquímico e rendimento de biogás e metano da co-digestão, com os inoculantes previamente preparados, na temperatura ambiente ($28 \pm 3,5$ °C) atingiram valores semelhantes a temperatura ideal (35 °C). Isso mostra a importância do uso de inoculantes no início do processo de digestão anaeróbia e o quanto eles favorecem o desenvolvimento de microrganismos específicos, garantindo estabilidade no processo e na produção de biogás e metano. Esses resultados promissores podem permitir o uso desse tipo de produção de energia nas regiões que apresentam temperaturas ligeiramente mais baixas e auxiliar na redução de custo operacional de biodigestores.

O presente projeto será de ampla relevância para a cadeia produtiva do biogás, pois visa contribuir com a identificação de produtos e/ou processos, que potencializam a produção de biogás e ampliem o desenvolvimento da tecnologia de biodigestores.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPELS, Lise et al. Anaerobic digestion in global bio-energy production: Potential and research challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15 n. 9, p.4295-430, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032111003686?via%3Dihub>>. Acesso em: 07 mai. 2018. doi:10.1016/j.rser.2011.07.121.

BATES, Scott. et al. Examining the global distribution of dominant archaea populations in soil. **Microbial Ecology and Functional Diversity of Natural Habitats**. v. 5, p. 908-917, 2011.

BIASI, Carlos. A. F. et al. **Energias renováveis na área rural do sul do Brasil**. Foz do Iguaçu: Itaipu Binacional, v. 1, 2018.

BHARATHIRAJA, B. et al. Biogas production – A review on composition, fuel properties, feed stock and principles of anaerobic digestion. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 90, p. 570-582, 2018. doi:10.1016/j.rser.2018.03.093.

BOHRZ, Gabrieli. I. **Geração de metano em lagoa anaeróbia: um estudo de caso em abatedouro de bovinos**. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Tecnologia, Santa Maria.

CARRILHO Nuno F. Q. Valorização de bio-resíduos alimentares por digestão anaeróbia descentralizada - Caso de estudo: Campus da FCT/UNL. 2012. p.126. **Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia)**, Universidade Nova de Lisboa.

CHEN, Si, et al., Linkages of Firmicutes and Bacteroidetes populations to methanogenic process performance. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 43, p. 771-781. 2016. doi: 10.1007/s10295-016-1760-8.

DECHRUGSA, Sumeth; KANTACHOTE, Duangporn; CHAIPRAPAT, Sumate. Effects of inoculum to substrate ratio, substrate mix ratio and inoculum source on batch co-digestion of grass and pig manure. **Bioresour. Technol.** v. 146, p.101–108, 2013. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241301119X>>. Acesso em: 07 mai. 2018. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.051.

DEUBLEIN, Dieter; STEINHAUSER, Angelika. **Biogas from Waste and Renewable Resources: An Introduction**. ed. 2., 2008.

FERREIRA-LEITAO, Viridiana, et al. Biomass residues in Brazil: Availability and potential uses. **Waste and Biomass Valorization**. v. 1, p. 65–76. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/17913/1/ld_683_B-3.pdf>. Acesso em: 26 mai. 2018. doi:10.1007/s12649-010-9008-8.

GEBREEYESSUS, Getachew; JENICEK, Pavel. Thermophilic versus Mesophilic Anaerobic Digestion of Sewage Sludge: A Comparative Review. **Bioengineering**. v. 3. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2306-5354/3/2/15>>. Acesso em: 7 jun. 2018. doi:10.3390/bioengineering3020015.

GRANADA, Camille. E., et al. Biogas from slaughterhouse wastewater anaerobic digestion is driven by the archaeal family *Methanobacteriaceae* and bacterial families *Porphyromonadaceae* and *Tissierellaceae*. **Renewable Energy**. v. 118, p. 840–846, 2018. doi:10.1016/j.renene.2017.11.077.

GUERI, M. V. D.; SOUZA, S. N. M. de; KUCZMAN, O. Parâmetros operacionais do processo de digestão anaeróbia de resíduos alimentares: uma revisão. *Biofix Scientific Journal*, v. 3, n. 1, p. 17-25, 2018.

GUERINI FILHO, M., et al. Biomass availability assessment for biogas or methane production in Rio Grande do Sul, Brazil. **Clean Technologies and Environmental Policy**. <https://doi.org/10.1007/s10098-019-01710-3>

GUO, Jianhua, et al. Dissecting microbial community structure and methane-producing pathways of a full-scale anaerobic reactor digesting activated sludge from wastewater treatment by metagenomic sequencing. **Microbial Cell Factories**. v.14. 2015. doi:10.1186/s12934-015-0218-4.

HAGOS, Kiros, et al. Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 16. p. 1485-1496. 2017. doi:10.1016/j.rser.2016.11.184.

HAN, G., et al. A comparative study on the process efficiencies and microbial community structures of six full-scale wet and semi-dry anaerobic digesters treating food wastes. **Bioresource Technology**. v. 245, p.869–875. 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.167.

HASAN, C. et al. Produção de biogás a partir de resíduos agroindustriais: Análise dos teores de sólidos totais, voláteis e fixos em amostras pré e pós digestão anaerobia. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**. v. 8. n.1. p. 257-273, 2019. doi: 10.5380/rber.v8i1.56321.

HASAN, C., et al. Biogas generation related to carbon removal from anaerobic co-digestion of sludge, blood, and swine manure combined in different proportions:

Production of biogas by anaerobic co-digestion. 2018. **Environmental Quality Management**. <https://doi.org/10.1002/tqem.21581>

HIDAKA, T.; TSUSHIMA, I.; TSUMORI, J. Comparative analyses of microbial structures and gene copy numbers in the anaerobic digestion of various types of sewage sludge. **Bioresource Technology**. v. 253, p.315–322. 2018. doi:10.1016/j.biortech.2017.12.097.

HOSSEINI, Seyed. E.; WAHID, Mazlan. A. Development of biogas combustion in combined heat and power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 40, p.868-875. 2014. doi:10.1016/j.rser.2014.07.204.

IPEA - Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Diagnóstico dos resíduos orgânicos do setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas. **Relatório de Pesquisa**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf>. Acesso em: 05 de maio de 2018.

JHA, Priyanka; SCHMIDT, Stefan. Reappraisal of chemical interference in anaerobic digestion processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 75. p. 954-971. 2017. doi:10.1016/j.rser.2016.11.076.

KIM, W.; WHITMAN, W. B. Methanogens. In **Encyclopedia of Food Microbiology**. p. 602–606. 2014. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00204-4.

KONRAD, Odorico, et al. **Atlas das biomassas do Rio Grande do Sul para produção de biogás e biometano**. Lajeado: Ed. da Univates, 2016.

KONRAD, Odorico, et al. Enhancing the analytical capacity for biogas development in Brazil : assessment of an original measurement system for low. **Engenharia Agrícola**. v. 36. p.792–798. 2016. doi:10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v36n5p792-798/2016.

LI, Y., et al. Effect of organic loading on the microbiota in a temperature-phased anaerobic digestion (TPAD) system co-digesting dairy manure and waste whey. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 99. p. 8777–8792. 2015. doi: 10.1007/s00253-015-6738-3.

LI, D., et al. Instability mechanisms and early warning indicators for mesophilic anaerobic digestion of vegetable waste. **Bioresource Technology**. v. 245. p. 90-97. 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.07.098.

LIU, T., et al. Importance of inoculum source and initial community structure for biogas production from agricultural substrates. **Bioresource Technology**. v. 245. p. 768–777. 2017. doi:10.1016/j.biortech.2017.08.213.

LORA, E. E. S.; VENTURINI, O. J. **Biocombustíveis**. v. 1. 2012. Rio de Janeiro: Interciência.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: ArtMed,

2016.

MARTINEZ, J., et al. Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety, and sustainability. 2009. **Bioresource Technology**. doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.038.

MATEO-SAGASTA, J. et al. Water pollution from agriculture: a global review. **FAO y IWMI**. 2017. doi.org/http://www.fao.org/3/a-i7754e.pdf

NARIHIRO, T.; SEKIGUCHI, Y. Microbial communities in anaerobic digestion processes for waste and wastewater treatment: a microbiological update. **Current Opinion in Biotechnology**. 2007. doi:10.1016/j.copbio.2007.04.003.

OLIVEIRA, S. V. et al. Generation of bioenergy and biofertilizer on a sustainable rural property. **Biomass and Bioenergy**. v. 35. n. 7. p. 2608-2618. 2011. doi:10.1016/j.biombioe.2011.02.048.

SAMBROOK, J., RUSSEL. D. W. **Molecular cloning**: a Laboratory manual, 3. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.

SCARLAT, N.; DALLEMAND, J.; FAHL F.. Biogas: developments and perspectives in Europe. **Renewable Energy**. 2018, doi:10.1016/j.renene.2018.03.006.

SCHNÜRER, A. **Biogas Production**: Microbiology and Technology. In: Hatti-Kaul, R., Mamo, G., Mattiasson, B. Anaerobes in Biotechnology. Springer International Publishing Cham, p. 195–234. 2016.

SILVA DOS SANTOS, I. F., et al. Assessment of potential biogas production from multiple organic wastes in Brazil: Impact on energy generation, use, and emissions abatement. **Resources, Conservation and Recycling**. v. 131, p. 54-63. doi:10.1016/j.resconrec.2017.12.012.

SOARES, C.; FEIDEN, A.; TAVARES, S. G. Fatores que influenciam o processo de digestão anaeróbia na produção de biogás. **Nativa**, Sinop. v.5. p.522-528. 2017. ISSN: 2318-7670.

SUN, LI, et al. Characterization of microbial community structure during continuous anaerobic digestion of straw and cow manure. **Microbial Biotechnology**. v.8. p. 815–827. 2015. doi.org/10.1111/1751-7915.12298.

TABATABAEI, M., et al. Importance of the methanogenic archaea populations in anaerobic wastewater treatments. **Process Biochemistry**. v. 45. p. 1214-1225. 2010. doi:10.1016/j.procbio.2010.05.017.

TILMAN, D., et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. v. 418. p. 671-677. doi:10.1038/nature01014.

TUFANER, F.; AVŞAR, Y. Effects of co-substrate on biogas production from cattle manure: a review. **International Journal of Environmental Science and Technology**. doi:10.1007/s13762-016-1069-1.

VENKITESHWARAN, Kaushik, et al. Relating Anaerobic Digestion Microbial Community and Process Function. **Microbiology Insights**. v. 8. p. 37-44. 2016. doi:10.4137/MBI.S33593.

VENTORINO, V., et al. Pre-treatment and inoculum affect the microbial community structure and enhance the biogas reactor performance in a pilot-scale biodigestion of municipal so waste. **Waste Manag**, 2018. doi: 10.1016/j.wasman.2017.12.005.

XU, R., et al. A critical review on the interaction of substrate nutrient balance and microbial community structure and function in anaerobic co-digestion. **Bioresource Technology**. v. 247. p. 1119-1127. doi:10.1016/j.biortech.2018.09.095.

ZHANG, C., et al. Reviewing the anaerobic digestion of food waste for biogas production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 38. p. 383-392. 2014. doi:10.1016/j.rser.2014.05.038.

ZIGANSHINA, E. E., et al. Microbial community diversity in anaerobic reactors digesting turkey, chicken, and swine wastes. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 24. p. 1464-1472. 2014. doi: 10.4014/jmb.1404.04043.