

# REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:  
Investigación, desarrollo y práctica.

**POTENCIAL DE REDUÇÃO DE MICRORGANISMOS  
TERMOTOLERANTES DE EFLUENTES DA PECUÁRIA  
BOVINA LEITEIRA POR MEIO DA BIODIGESTÃO  
ANAERÓBIA COM E SEM INOCULAÇÃO**

Júlio Maiorquino Manzoli <sup>1</sup>  
Amanda Gutierrez de Souza <sup>2</sup>  
\* Valter Cesar de Souza <sup>2</sup>  
Rejane Maria Tommasini Grotto <sup>2</sup>  
Sergio Augusto Rodrigues <sup>2</sup>  
Valéria C. Rodrigues Sarnighausen <sup>2</sup>

**POTENTIAL OF REDUCING THERMOTOLERANT  
MICROORGANISMS FROM LIVESTOCK WASTEWATER THROUGH  
ANAEROBIC DIGESTION WITH AND WITHOUT INOCULUM**

Recibido el 4 de enero de 2022. Aceptado el 2 de mayo de 2022

## Abstract

Brazil has agribusiness as one of its major economics components, representing about 21.4% of the Gross Domestic Product (GDP) in the year 2019, according to Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock Industry and Supply report. Further, the dairy cattle herd has an important role such as economically, with a gross income amount of production around R\$33 billion annually, as well as socio-environmentally, because of its great volume of livestock waste that is a source of contamination and proliferation of pathogenic microorganisms, which can be led to significant public health issues and environmental pollution. Thus, anaerobic digestion appears as an available solution for these major problems, likewise as a profitable opportunity with its byproducts - biogas and biofertilizer. There are a lot of concerns about the reintroduction of the biofertilizer in the field and one of them relates to the minimum quantity allowed of thermotolerant microbes, related to fecal contamination. In such manner, the objective of this work was to identify the potential of reduction of thermotolerant microorganisms during the process of anaerobic digestion of dairy cattle manure, in two separate treatments, with and without inoculum, utilizing information from the database gathered by the DNA extraction of these microorganisms. The result obtained with the inoculum treatment was a 100% reduction of the thermotolerant organisms, in a different manner the non-inoculum group encountered an 80% reduction. With the present study, the hypothesis from the inoculum's determinant role of thermotolerant-reduction from animal manure during anaerobic digestion was corroborated.

**Keywords:** biofertilizer, metagenomic, sustainability.

<sup>1</sup> Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Brasil.

<sup>2</sup> Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista, (Unesp), Brasil.

\*Autor correspondente: Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Botucatu, Universidade Estadual Paulista. Avenida Universitária, 3780 – Altos de Paraíso, Botucatu/SP – CEP 18610-034. Brasil. Email: [valter.souza@unesp.br](mailto:valter.souza@unesp.br)

## Resumo

O Brasil tem como um dos pilares de sua economia o agronegócio, representando cerca de 21.4% do Produto Interno Bruto (PIB) no ano de 2019, segundo relatório do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O rebanho de bovinos leiteiros confere um papel fundamental tanto economicamente, com um valor bruto de produção de 33 bilhões de reais anuais, quanto ambientalmente, pois gera grandes quantidades de dejetos que são fonte de contaminação e proliferação de microrganismos patógenos, podendo ocasionar problemas de saúde pública e poluição ambiental. Diante deste problema, a digestão anaeróbia configura-se como uma possível solução para as questões levantadas, capaz inclusive de produzir subprodutos economicamente vantajosos, o biogás e o biofertilizante. Existem diversas reivindicações acerca da reintrodução do biofertilizante na lavoura e uma delas refere-se à quantidade mínima permitida de coliformes termotolerantes, os quais são relacionados à contaminação fecal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi identificar o potencial de redução de microrganismos termotolerantes ao longo do processo de biodigestão anaeróbia de efluentes da pecuária bovina leiteira, em dois tratamentos, com e sem inoculação, utilizando informações de banco de dados referente à extração de DNA da microbiota destes locais. O resultado obtido no grupo com inóculo foi de 100% de redução de organismos termotolerantes, ao passo que no grupo sem adição do digestato foi percebido uma redução de 80%. Com o presente estudo, corrobora-se a hipótese de que o inóculo apresenta um papel determinante para a diminuição dos microrganismos termotolerantes durante a digestão anaeróbia de dejetos animais de produção.

**Palavras-chave:** biofertilizante, metagenômica, sustentabilidade.

## Introdução

O Agronegócio brasileiro chegou à marca de 641 bilhões de reais de faturamento bruto relativo à produção da pecuária e das principais lavouras no ano de 2019 (Brasil, 2020). Um dos grandes componentes da produção do meio rural, a pecuária leiteira, atingiu o valor bruto de produção de 33 bilhões de reais anuais (IBGE, 2020). Este avanço no campo deve ser apoiado nos conceitos da economia circular para sustentar a cadeia produtiva em crescimento, pois as externalidades negativas, poluição ambiental, pode influenciar diretamente na longevidade do negócio. A produção intensiva, do gado de leite, gera elevado volume de dejetos, biomassa, fonte de contaminação ambiental e proliferação de microrganismos patógenos (Orrico Júnior *et al.*, 2012). Quando manejados inadequadamente, os dejetos (fezes e urina) contaminam o solo, a água (superficial e subterrânea) e o ar por compostos como metano e amônia, além da ameaça sanitária na forma de coliformes fecais e pela propagação de insetos (Amaral *et al.*, 2004).

Uma alternativa sustentável para o tratamento desta biomassa é a digestão anaeróbia (DA), processo biológico de reciclagem energética de nutrientes contidos na biomassa, a conversão de material orgânico complexo em biogás e biofertilizante realizada por um consórcio microbiano (Talbot *et al.*; Ward *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2011).

O processo de digestão anaeróbia, que é um processo *beneficiamento biológico*, reduz a carga de coliformes, o biofertilizante oriundo do biorreator apresenta nutrientes essenciais às plantas, tais

quais o nitrogênio (N), fosfato (P) e potássio (K) (Arruda *et al.*, 2002) e, apresenta baixo custo de aplicação e manutenção quando comparado aos fertilizantes minerais (Barbosa e Langer, 2011). O uso do biofertilizante segue padrões ambientais e sanitários, de acordo com a resolução CONAMA (2005), sua utilização na lavoura depende da contagem de coliformes termotolerantes, não deverá exceder o limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mililitros, em 80% ou mais, de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral.

O processo de biodigestão anaeróbia, que consiste em fases de hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese, além de proporcionar destino ambientalmente correto para resíduos da agropecuários, produção de produção de biogás e também de biofertilizantes, é capaz de agir como sanitizante de microrganismos patogênicos como coliformes fecais termotolerantes, sendo a maior parte deles constituídos por *Escherichia coli*, que juntamente com os demais termotolerantes são nocivos à saúde humana e animal (Amaral *et al.*, 2000; Amaral *et al.*, 2004).

O efluente gerado de um proceso de biodigestão aneróbia pode ser utilizado em outros processos como inóculo, por ser um substrato com comunidade de microrganismos consolidada, ou seja, uma população extra de microrganismos adaptados ao proceso de produção de metano. Sendo assim, com a inserção do inóculo é possível aumentar a atividade da comunidade microbológica do dejetos, antecipando o pico de produção de biogás, além de promover a melhor redução de sólidos totais e voláteis (Xavier *et al.*, 2010).

Neste contexto, este trabalho tem o objetivo de examinar o potencial de redução de microrganismos termotolerantes ao longo do processo de biodigestão anaeróbia de efluentes da pecuária bovina leiteira, com e sem a utilização de inoculação.

## Metodologia

### Delineamento experimental

Os dados do presente estudo são provenientes da amostragem e sequenciamento realizados em experimentos com biodigestores em batelada, referentes ao estudo da biodigestão anaeróbia de efluentes da pecuária bovina leiteira, em dois tratamentos, sendo um com biodigestores abastecidos com afluente composto por uma mistura de dejetos diluído em água (substrato com 40% de dejetos bovino e 60% de água) e o outro tratamento com o afluente composto por dejetos diluído com inóculo (substrato com 40% de dejetos e 60% inóculo).

Os substratos de cada tratamento foram preparados visando padronizar os sólidos totais em torno de 8% (Salam *et al.*, 2015; Otaraku e Ogedengbe, 2013). Utilizou-se a metodologia de APHA (2005) para determinar o teor de sólidos totais e voláteis.

O dejetto de bovino leiteiro usado neste estudo foi coletado na Fazenda Experimental da Zootecnia da UNESP de Botucatu em São Paulo. A coleta de aproximadamente 60 kg foi efetuada por raspagem dos dejetos contidos na área de ordenha. O dejetto apresentou um pH de 5.3 e 15.20 % de sólidos totais. A fim de melhorar a eficiência de degradação da biomassa no sistema anaeróbio, o dejetto foi pré tratado por trituração até uma faixa de tamanho de partícula de dois milímetros.

O inóculo, também chamado de digestato, foi obtido a partir do efluente de biodigestores contínuos estabilizados de uma fazenda do município de São Pedro-SP, em condições ambientais semelhantes a experimento, abastecidos por afluentes de dejetos bovinos leiteiros, constituindo-se de uma comunidade microbiológica consolidada capaz de reduzir sólidos totais e voláteis. O inóculo apresentou um pH de 7.7 e 1.88 % de sólidos totais e 1.27 % de sólidos voláteis.

Foram utilizados 28 biodigestores de 1.8 litros, com gasômetro acoplado para a contenção e esgotamento do efluente e gás produzido, sendo 14 biodigestores por tratamento. Em cada tratamento, uma amostra foi coletada inicialmente dos respectivos afluentes, ou seja, logo após a diluição do dejetto, em água ou com inóculo, anteriormente à alimentação dos biodigestores (início do experimento). Nos momentos subsequentes de 28, 35, 41, 49, 56, 63 e 70 dias após o início do processo de digestão anaeróbia foram utilizados dois biodigestores para a retirada das amostras em cada tratamento, visando analisar a dinâmica microbiana relativa a um período de 70 dias. As amostras foram padronizadas a uma quantidade de 250 µL e preservadas em freezer numa temperatura de -70°C até que fossem submetidas ao procedimento de sequenciamento metagenômico.

O experimento foi conduzido na temperatura ambiente local, condição corriqueira em meio rural, a qual variou no período do processo de biodigestão entre 17 e 30 °C (mensurada semanalmente), apresentando-se pouco abaixo das condições mesofílicas (30 a 40 °C).

#### Sequenciamento e banco de dados

Existem várias etapas envolvidas em um projeto de sequenciamento 16S metagenômico. Isso inclui extração de DNA, preparação de biblioteca visando a variável V3 e regiões V4 do gene 16S rRNA, sequenciamento e análise estatística. O DNA genômico foi extraído usando o QIAamp DNA DNeasy PowerSoil (Qiagen, 2017) de acordo com as instruções do protocolo DNeasy PowerSoil com algumas pequenas modificações.

Em seguida, o material obtido foi quantificado usando Espectrofotômetro *Nanodrop*. O gene 16S do DNA extraído foi amplificado com os conjuntos de *primers* amplamente conservados visando as regiões V3-V4. Esta etapa usou *AMPure XP beads* para purificar o *amplicon* 16S V3 e V4, seguiu-se o protocolo *PCR Clean-up* do guia de preparação da biblioteca de

sequenciamento metagenômico 16S. A reação em cadeia polimerase (PCR) foi realizada em um termociclador (System 9700). Após amplificação foi feita uma eletroforese para certificar que as amostras foram todas amplificadas corretamente, o tamanho esperado do *amplicon* foi de aproximadamente 550 pb.

Foi utilizado o sequenciamento de nova geração (NGS) pelo método de amplificação em ponte utilizado no sequenciador *Genome Analyser* (ILLUMINA, 2017). O sequenciamento foi realizado no *Sistema Illumina MiSeq* e os dados produzidos foram tratados pelo *16S Metagenomics App* na plataforma de análise *BaseSpace*. Os relatórios de resumo de cada amostra foram analisados de acordo com a classificação taxonômica (reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie), comparando-se as amostras.

Por fim, a partir das amostras do material coletado dos biodigestores do delineamento deste experimento, foi utilizado um banco de dados fornecido pelo *BaseSpace 16S App Metagenomics*, constando um total de 728 microrganismos diferentes detectados (componente qualitativo), considerou-se a taxonomia correspondente ao nível de gênero e o total de número de *reads* (componente quantitativo), denotando o número de leituras realizadas no sequenciamento.

#### Análise exploratória dos dados

A partir do sequenciamento, inicialmente, foi realizada uma análise exploratória dos dados por meio de tabelas de frequências e contingência a fim de organizar um banco de dados com o consórcio microbiano de cada período e identificar os gêneros mais representativos de coliformes termotolerantes. Para a análise dos dados, utilizou-se como referência 4 gêneros de coliformes termotolerantes, que indicariam a contaminação de organismos provenientes da microbiota intestinal de animais: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (Guentzel, 1996; Feng *et al.*, 2002; CONAMA, 2005). Com o intuito de avaliar a diversidade alfa das amostras, ou seja, a diversidade referente a todos os gêneros identificados na microbiota dentre o total de leituras, realizou-se o cálculo do *Índice de Simpson (D)* (Equação 1) (Colwell e Levin, 2009).

$$D = \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Equação (1)

sendo  $k$  o número de gêneros identificados e  $p_i$  a proporção de cada gênero na amostra, ou seja,  $p_i = n_i/N$  onde  $n_i$  representa o número de *reads* do gênero  $i$  e  $N$  o número total de indivíduos identificados.

Para identificar as bactérias termotolerantes que mais ocorreram foram construídas tabelas de frequência simples, bem como tabelas de contingência, visando avaliar possíveis associações da distribuição de bactérias termotolerantes entre os momentos de avaliação e os dois tratamentos (com e sem inóculo). As análises foram realizadas no ambiente *R* (*R Core Team*, 2021).

## Resultados e discussão

O sequenciamento metagenômico do DNA microbiano presente na matéria orgânica em biodigestão gerou um total de 1,193,717 *reads* (leituras) e um total de *reads* classificados em gênero de 892,774, o que representa 74.8% de identificação global de gêneros. Considerando diferentes períodos e tipo de tratamento, observa-se na Tabela 1 as respectivas porcentagens de classificação de gênero, dentre as amostras retiradas num período de 70 dias.

**Tabela 1.** Total de *reads* e porcentagem de leituras classificadas em gênero.

Tratamento	Período (dias)	Total <i>reads</i>	Nº <i>reads</i> classificadas	% <i>reads</i> classificadas
Com inóculo	0	65,164	44,595	68.44%
	28	67,160	40,710	60.52%
	35	72,888	54,375	74.96%
	41	81,759	53,415	65.01%
	49	81,521	52,346	64.13%
	56	69,986	44,500	63.85%
	63	64,493	41,141	63.69%
	70	81,540	52,061	63.81%
Sem inóculo	0	95,526	80,515	84.29%
	28	64,477	55,489	85.87%
	35	86,676	63,016	74.44%
	41	79,879	68,425	85.42%
	49	81,327	69,389	85.32%
	56	63,529	54,273	85.28%
	63	71,627	61,332	85.61%
	70	66,165	57,192	86.11%

No tratamento com inóculo, obteve-se um total de 383,143 leituras com gêneros identificados, representando 65.5% de sucesso na classificação. No tratamento sem inóculo, alcançou-se um total de 509,631 leituras com gêneros identificados, equivalente a um valor de 83.6% de gêneros classificados. Na amostra inicial observa-se 68.44% de sucesso na classificação no tratamento com inóculo e 84.29% sem o inóculo, chegando ao final de 70 dias, respectivamente, a 63.81% e 86.11% de classificação. Nota-se uma diferença razoável nas porcentagens de classificação em gênero, sendo em média menor no tratamento com inóculo (Tabela 1). A isto, atribui-se primeiro ao fato de ainda existir uma grande gama de organismos não classificados nos bancos de dados, como é o caso do filo *Bacteroidetes*, onde aproximadamente 91.9% dos organismos encontrados não possuem classificação (Barros *et al.*, 2017). Ademais, a introdução do inóculo pode ter levado a um aumento na biodiversidade local, resultando numa queda na taxa de classificação pelo motivo citado anteriormente.

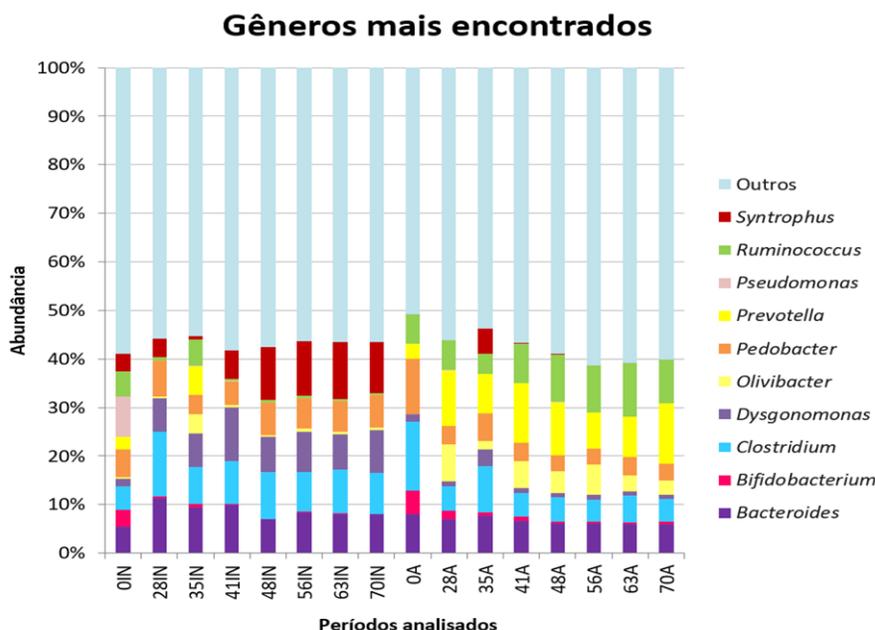
Para checar a validade do segundo argumento que a introdução do inóculo possa ter elevado a biodiversidade local, o *Índice de Simpson (D)* foi utilizado. Este índice de diversidade varia de 0 a 1, revela uma maior diversidade quando se aproxima do valor zero. Como visto na Tabela 2, os índices obtidos foram próximos em todos os períodos, com exceção do início (dia 0), indicando uma diversidade microbiana semelhante. No início do experimento (dia 0) o índice de Simpson indica maior diversidade no tratamento com inóculo ( $D=0.0288$ ) ao se comparar com o tratamento sem inóculo ( $D=0.0577$ ). No entanto, durante os períodos da biodigestão avaliados, observa-se uma estabilização na diversidade de microorganismos nos dois tratamentos, apresentando resultados do índice D semelhantes entre si.

**Tabela 2.** Valores do *Índice de Simpson (D)* para cada grupo e períodos avaliados.

Tratamento	Períodos (em dias)							
	0	28	35	41	49	56	63	70
Com inóculo (IN)	0.0288	0.0499	0.0357	0.0432	0.0438	0.0449	0.0454	0.0446
Sem inóculo (A)	0.0577	0.0422	0.0358	0.0432	0.0416	0.0375	0.0400	0.0425

A Figura 1 apresenta o número de leituras dos gêneros observados no início do experimento (indicado como dia 0) até o último período do estudo (após 70 dias do início do experimento) em cada tratamento, sendo A indicando o tratamento com água e IN com inóculo. Assim, tomando uma perspectiva mais geral da análise metagenômica, os 10 gêneros com maior número de leituras verificadas durante o experimento foram os seguintes: *Syntrophus*, *Ruminococcus*, *Pseudomonas*, *Prevotella*, *Pedobacter*, *Olivibacter*, *Dysgonomonas*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* e *Bacteroides* (Figura 1).

A adição de inóculo, introduzindo uma fração de material estabilizado, permite que o substrato receba uma população adicional de microrganismos típicos da digestão anaeróbia, acelerando o processo de biodigestão (Xavier e Lucas Junior, 2010). Na Figura 1 observa-se uma diferença no padrão populacional de microrganismos dos dois tratamentos (A: água e IN: inóculo), sendo que o consórcio microbiano observado no tratamento com inóculo pode ser um dos possíveis fatores que corroboram para a maior redução dos organismos termotolerantes. Observa-se que os gêneros *Bacteroides* e *Clostridium* se mostraram presentes nos dois tratamentos durante todo o período, os quais são importantes para o início do processo de fermentação (característicos das fases hidrolítica e acidogênica). No tratamento sem inóculo (com água), os gêneros *Prevotella* e *Ruminococcus* (característicos nas primeiras fases do processo de digestão anaeróbia) apresentaram maiores percentuais de leituras, enquanto no tratamento com inóculo observou-se mais leituras dos gêneros *Dysgonomonas* e *Syntropus* em todo período analisado.



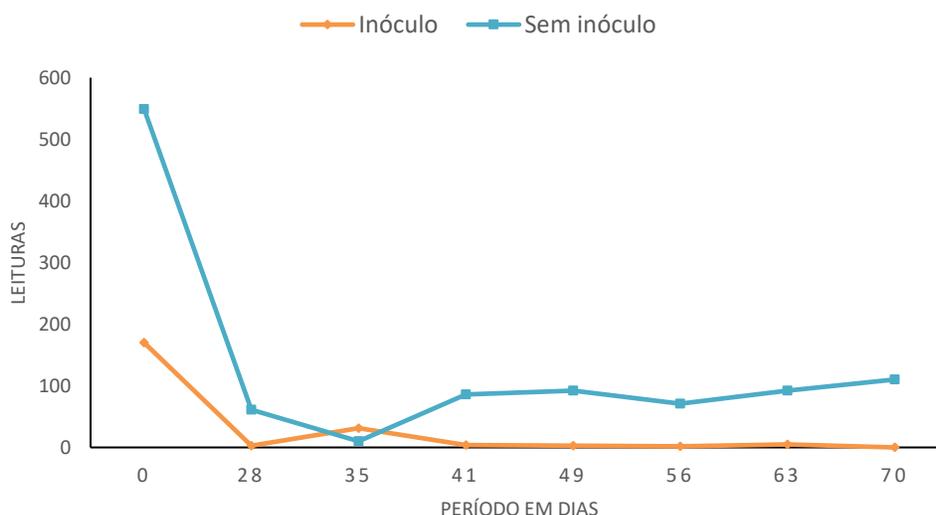
**Figura 1.** Gêneros mais encontrados nos períodos para os dois tratamentos (A-diluição com água e IN com inóculo).

A partir do número de *reads* gerado foi possível estabelecer uma relação de redução de organismos termotolerantes na biodigestão. Na Tabela 3, verifica-se no grupo tratado com inóculo, no início da biodigestão, havia 0.38% de microbiota termotolerante e no final de 70 dias não foram identificados esses gêneros, indicando uma redução de 100%. No grupo sem inóculo, inicialmente havia 0.68% e encerrou-se o experimento, aos 70 dias, com 0.19% de termotolerantes, indicando uma redução de 80%.

**Tabela 3.** Relação de redução de termotolerantes, entre início e fim do processo de DA.

Tipo	Gênero	Com Inóculo		Água (Sem inóculo)	
		Inicial (0 d)	Final (70 d)	Inicial (0 d)	Final (70 d)
Termotolerante	<i>Escherichia</i>	150 (0.34%)	0	534 (0.66%)	100 (0.17%)
	<i>Klebsiella</i>	13 (0.03%)	0	3 (0%)	1 (0%)
	<i>Enterobacter</i>	7 (0.02%)	0	11 (0.01%)	8 (0.01%)
	<i>Citrobacter</i>	0	0	1 (0%)	1 (0%)
Total Termotol.	-	170 (0.38%)	0 (0%)	549 (0.68%)	110 (0.19%)
Outros gêneros	-	44,425 (99.62%)	52,061 (100%)	79,966 (99.32%)	57,083 (99.81%)
Total	-	44,595 (100%)	52,061 (100%)	80,515 (100%)	57,192 (100%)

Percebe-se que a quantidade inicial de leituras de microrganismos termotolerantes no tratamento com água apresentou-se maior em comparação com o tratamento que recebeu inóculo (Tabela 3). A água utilizada foi retirada de poço artesiano. Sabe-se que, em vista de resolução específica (CONAMA, 2005) a contagem de termotolerantes da água não pode ultrapassar 200 por 100 mililitro de amostra, ou seja 2000 leituras por litro. A Tabela 3 indica que houve 534 contagens em 250  $\mu$ L, que equivale a  $2.136 \cdot 10^3$  leituras por litro, indicando que a água do poço artesiano mais o dejetos a ser tratado apresenta quantidade de microrganismos termotolerantes acima do indicado pela CONAMA. Esta é uma condição corriqueira em meio rural onde a água não é tratada devidamente, sendo ainda utilizada para limpeza de baias, cujo efluente acaba sendo destinado ao solo e cursos d'água. Nesse sentido, comparando o potencial de redução de termotolerantes entre os tratamentos utilizados, o uso de inóculo mostra-se mais eficiente em reduzir o número de termotolerantes presentes no dejetos a ser tratado, quando comparado com a água que também possui uma carga de microrganismos dessa natureza, sendo o processo de biodigestão anaeróbia mais eficiente em termos de redução dos riscos ambientais quanto à saúde humana e animal ao se utilizar o efluente para fins agrícolas.



**Figura 2.** Redução de organismos termotolerantes no período de 70 dias de biodigestão.

Comparativamente, Junior *et al.* (2018) e Amaral *et al.* (2000) estudaram a influência do inóculo na biodigestão de dejetos da pecuária e aviário respectivamente, obtendo maior redução com inóculo. Estes resultados corroboram com a hipótese de que o inóculo apresenta um papel determinante para a diminuição dos microrganismos em questão na digestão anaeróbia de

dejetos animais. Além disso, a adição de inóculo é capaz de proporcionar um aumento da velocidade de reações relacionadas ao processo de biodigestão anaeróbia, visto que possui uma comunidade microbiológica consolidada capaz de reduzir sólidos totais e voláteis, produzindo maior quantidade de biogás, ao ser comparado com tratamentos que recebem água e dejetos apenas, além de redução de demanda química e biológica de oxigênio (DQO e DBO), reduzindo o potencial de poluição de solos e cursos d'água (Paes et al., 2020; Xavier; Lucas Júnior, 2010).

A evolução do número de *reads* de bactérias termotolerantes no período pode ser observado na Figura 2, indicando o potencial de redução do tratamento com inóculo comparado ao grupo sem inóculo.

### Conclusões

A quantificação dos microrganismos encontrados através do sequenciamento metagenômico do material submetido a digestão anaeróbia de efluentes da pecuária bovina leiteira, mostrou o potencial de redução de organismos termotolerantes a partir do implemento de inóculo nos biodigestores analisados. O resultado obtido no tratamento com o inóculo foi de 100% de redução, ao passo que para o grupo sem inóculo foi de 80% de redução dos organismos termotolerantes.

### Referências bibliográficas

- Amaral, L. A., Schocken, D.B.L., Lucas Junior, J. (2000) Redução de bactérias indicadoras de poluição fecal em estrume de aves de postura tratados por biodigestão anaeróbia. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, **2** (1), 27-30. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2000000100004>
- Amaral, C. M. C. do., Amaral, L. A. do; Junior, J. de L., Nascimento, A. A., Ferreiras, de S. D., Machado, M. R. F. (2004) Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, **34**(6), 1897-1902. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000600035>
- APHA, American Public Health Association (2005) *Standard methods for examination of water and wastewater*. Washington, American Water Works Association, 20th ed. Acesso em 03 de fevereiro de 2021, disponível em: [http://srjstaff.santarosa.edu/~oraola/Assets/APHA\\_SM\\_20.pdf](http://srjstaff.santarosa.edu/~oraola/Assets/APHA_SM_20.pdf)
- Arruda, M. H., Amaral, L. de L., Pires, O. P. J., Barufi, C. R. V. (2002) Dimensionamento de Biodigestor para Geração de Energia Alternativa. *Revista Científica Eletrônica De Agronomia*, **1**(2), 1-8.
- Barbosa, G., Langer, M. (2011) Uso de biodigestores em propriedades rurais: uma alternativa à sustentabilidade ambiental. *Unoesc & Ciência-ACSA*, **2** (1), 87-96. Acesso em 03 de março de 2021, disponível em: <https://portalperiodicos.unoesc.edu.br/acsa/article/view/864>
- Barros, V. G., Oliveira, R. A., Duda, R. M., Rodrigues, C. S. D. (2017) *Produção de metano de vinhaça com suplementação de torta de filtro em reatores UASB em série, mesofílicos e termofílicos: Desempenho do processo e diversidade microbiana*. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

- Brasil (2020) *Agropecuária brasileira em números*. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Acesso em 03 de janeiro de 2020, disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>
- CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2018) Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* - Determinação pela técnica de tubos múltiplos. Norma Técnica, L5.202, 5ª edição.
- Colwell, R.K; Levin, S.A. (2009) *Biodiversity: Concepts, Patterns, and Measurement*. Princeton Guide to Ecology, 663 pp, 257-263.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005) Resolução no 357 de 17 de Março, 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Acesso em 15 de março de 2021, disponível em: [http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO\\_CONAMA\\_n\\_357.pdf](http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf)
- Feng, P., Weagant, S.D., Grant, M.A. (2002) Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: *Bacteriological analytical manual online*, 4, Food and Drug Administration (FDA), Bacteriological Analytical Manual Online, 8th Edition, Silver Spring.
- Guentzel, M. N. (1996) *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. In: Baron S. (Eds.). *Medical Microbiology*, v. 8, c. 26, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8035/>
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020) *Pesquisa Trimestral do Leite*, Brasília: IBGE. Acesso em 20 de maio de 2021, disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9209-pesquisa-trimestral-do-leite.html?edicao=28823&t=destaques>
- Illumina (2017) 16S Metagenomics Studies with the MiSeq System. Disponível em: [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote\\_16s\\_sequencing.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/appnotes/appnote_16s_sequencing.pdf)
- Junior, S. R. L; Paes, J. L., Alves, T. B. S. (2018) Efeito da adição de inóculo no processo de biodigestão anaeróbica de dejetos de bovino. *VII Congresso Brasileiro de Energia Solar*. Fortaleza, Brasil.
- Nelson, M. C., Morrison, M., Zhongtang, Y. (2011) A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters. *Bioresource Technology*, **102**(4), 3730–3739. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.11.119>
- Orrico Júnior, M. A. P., Orrico, A. C. A., Júnior, J. L., Sampaio, A. A. M., Fernandes, A. R. M., Oliveira, E. A. (2012) Biodigestão anaeróbica dos dejetos da bovinocultura de corte: influência do período, do genótipo e da dieta. *Revista Brasileira de Zootecnia*, **41**(6), 1533-1538. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000600030>
- Otaraku, I. J., Ogedengbe, E.V. (2013) Biogas production from sawdust waste, cow dung and water hyacinth effect of sawdust concentration, *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, **2** (6), 91-93. Acesso em 15 de maio de 2021, disponível em: <https://www.build-a-biogas-plant.com/PDF/IJAIEM-2013-06-04-002.pdf>
- Pace, N. R., Stahl, D. A., Lane, D. J., Olsen, G. J. (1986) The Analysis of Natural Microbial Populations by Ribosomal RNA Sequences. In: Marshall, K.C. (eds) *Advances in Microbial Ecology*. 9. Springer, Boston, MA
- Paes, J. L.; Alves, T. B. S., da Silva, L. D. B., Marques, A. D., S., Dias, V. R. S. (2020) Use of inoculum in biodigesters with cattle manure under conventional and organic production systems. *Engenharia Agrícola* **40**(2):146–153. <https://doi.org/10.1590/1809-4430-Eng.Agric.v40n2p146-153/2020>
- Qiagen (2017). DNeasy PowerSoil Kit Handbook For the isolation of microbial genomic DNA from all soil types. disponível em: <https://www.qiagen.com/de/resources/download.aspx?id=5a0517a7-711d-4085-8a28-2bb25fab828a&lang=en>
- RCore Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org>
- Salam, B., Biswas, S., Rabbi, M.S. (2015.) Biogas from Mesophilic Anaerobic Digestion of Cow Dung Using Silica Gel as Catalyst. *Procedia Engineering*, **105**, 652-657. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.05.044>
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., Hajibaei, M. (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, **21**(8), 1794-1805.

- Talbot, G., Topp, E., Palin, M. F., Massé, D. I. (2008) Evaluation of molecular methods used for establishing the interactions and functions of microorganisms in anaerobic reactors. *Water Research*, **42**(3), 513–537.
- Ward, A. J., Hobbs, P. J., Holliman, P. J., Jones, D. L. (2008) Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, **99**(17), 7928–7940.
- Wen, Y., Xiao, F., Wang, C., Wang, Z. (2016) The impact of different methods of DNA extraction on microbial community measures of BALF samples based on metagenomic data. *American Journal of Translational Research*, **8**(3), 1412–1425.
- Xavier, C. A. N., Lucas Junior, J. (2010) Parâmetros de dimensionamento para biodigestores batelada operados com dejetos de vacas leiteiras com e sem uso de inóculo. *Revista Engenharia Agrícola*, **30**(2), 212-223.