



ESTUDO DA DIVERSIDADE MICROBIANA EM PROCESSO DE DIGESTÃO ANAERÓBIA DE RESÍDUOS SÓLIDOS ORGÂNICOS

MICROBIAL DIVERSITY STUDY IN ANAEROBIC DIGESTION PROCESS OF SOLID ORGANIC WASTE

Gracielle Rodrigues Dantas⁽¹⁾
Valderi Duarte Leite⁽²⁾
Evelyne Morgana Costa⁽³⁾

Resumo

A digestão anaeróbia de resíduos orgânicos tem sido apresentada como uma tecnologia amplamente utilizada e eficiente no tratamento dos mesmos, resultando na produção de energia renovável a partir da geração do biogás. Muitos estudos têm sido realizados para compreender o processo de digestão anaeróbia e caracterizar os microrganismos responsáveis pelas conversões bioquímicas. O objetivo desse trabalho consistiu em realizar o estudo da diversidade microbiológica envolvendo *árqueas* em processos de digestão anaeróbia de resíduos sólidos orgânicos, utilizando lodo anaeróbio de esgoto sanitário como inóculo. Para isso, foi realizada a extração de DNA, seguida de PCR-DGGE, e por fim sequenciamento genético das *árqueas* no resíduo em processo de digestão anaeróbia. Os resultados mostraram que as principais espécies de *árqueas* foram: *Uncultured Methanobacteriaceae archaeon*, *Uncultured archaeon*, *Uncultured Methanobrevibacter sp.* e *Uncultured Methanosarcinales archaeon*. Sabendo da diversidade de microrganismos em diferentes substratos, e da complexidade da identificação dos mesmos, o desafio é aplicar os dados a respeito da diversidade microbiana gerados com esses métodos em estratégias mais eficientes de tratamento de resíduos sólidos através da seleção, utilização e/ou estímulo de populações microbianas específicas presentes em reatores de digestão anaeróbia.

Palavras-chave: Digestão anaeróbia. Microrganismos metanogênicos. PCR-DGGE. Resíduos orgânicos.

Abstract

Anaerobic digestion of organic waste has been presented as a widely used and efficient technology in the treatment of the same, resulting in the production of renewable energy from biogas generation. Many studies have been conducted to understand the process of anaerobic digestion and characterize microorganisms responsible for biochemical conversions. The aim of this study is to conduct the study of microbial diversity involving archaea processes anaerobic digestion of organic waste using anaerobic sludge sewage as inoculum. For this,

¹Doutoranda em Engenharia Ambiental pela Universidade Estadual da Paraíba. Endereço eletrônico: graci_ufrn@hotmail.com

²Doutor em Hidráulica e Saneamento pela EESC/USP. Endereço eletrônico: mangabeiraleite@gmail.com

³Graduanda em Engenharia Sanitária e Ambiental pela UEPB. Endereço eletrônico: evelyne.fcosta@gmail.com



DNA extraction was performed, followed by PCR-DGGE and finally archaeal genome sequencing the residue biostabilization process. The results showed that the main species of archaea were Uncultured Methanobacteriaceae archaeon, Uncultured archaeon, Uncultured Methanobrevibacter sp. and Uncultured Methanosarcinales archaeon. Knowing the diversity of microorganisms on different substrates, and the complexity of identifying them, the challenge is to apply the data on the microbial diversity generated with these methods more efficient strategies for the treatment of solid waste through the selection, use and / or stimulus specific microbial populations present in anaerobic digestion reactors.

Keywords: Anaerobic digestion. Methanogenic microorganisms. PCR-DGGE. organic waste.

1 Introdução

A digestão anaeróbia (DA) é um processo biológico no qual diferentes grupos de microrganismos decompõem materiais orgânicos biodegradáveis na ausência de oxigênio molecular livre. Uma série de reações metabólicas, tais como hidrólise, acidogênese, acetogênese e metanogênese estão envolvidos no processo de decomposição anaeróbia (PARK *et al.*, 2005; CHARLES *et al.*, 2009).

Atualmente, uma vasta gama de tecnologias envolvendo a DA é utilizada para converter materiais como estrume animal, efluentes urbanos e industriais e, particularmente, resíduos sólidos orgânicos, em biogás.

Sabendo que tal processo é de dominância de microrganismos, a microbiologia dos processos de DA é complexa, pois a eficiência do processo depende das interações de vários grupos tróficos bacterianos envolvidos (ALVARADO *et al.*, 2014). O conhecimento da composição bacteriana dos resíduos sólidos possibilita a seleção de métodos adequados para o seu tratamento e destinação final. Assim, a decomposição da matéria orgânica através da digestão anaeróbia dependerá da interação entre os vários grupos de microrganismos de diferentes níveis tróficos, em que o substrato utilizado por um grupo de bactérias pode ter sido gerado por outro grupo.

Sobre a importância do domínio Archaea, o emprego dos organismos metanogênicos em saneamento ambiental é utilizado em busca da mineralização da matéria orgânica, bem como produção de metano. Estudos nessa temática descrevem as espécies bacterianas encontradas, bem como as interações e papéis-chaves das mesmas no processo de decomposição anaeróbia, em particular no que diz respeito a lodo de esgoto sanitário (MEESAP *et al.*, 2012). Porém, processos envolvendo isolamento e caracterização de bactérias metanogênicas em resíduos sólidos orgânicos (RSO) – particularmente substratos envolvendo resíduos vegetais e lodo anaeróbio ainda não são bem esclarecidos. Várias



ferramentas analíticas de biologia molecular, incluindo reação em cadeia da polimerase (PCR) e as suas variantes, como por exemplo, eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), hibridação fluorescente *in situ* (FISH), polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), entre outros, tem sido aplicadas no estudo das comunidades bacterianas em processos de digestão anaeróbia (MONTERO *et al.*, 2009;. SHIN *et al.*, 2010; NELSON *et al.*, 2011.; SUPAPHOL *et al.*, 2011).

As técnicas hoje utilizadas na genética molecular têm sido desenvolvidas a partir da pesquisa acadêmica básica, em diferentes campos da atividade científica. As limitações nos métodos microbiológicos tradicionais, aliadas ao avanço tecnológico na área de biologia molecular, fazem com que as técnicas moleculares sejam, no momento, muito utilizadas para o estudo da diversidade microbiológica em processos de digestão anaeróbia.

O desafio é aplicar os muitos dados a respeito da diversidade microbiana, gerados com esses métodos em estratégias mais eficientes de tratamento de resíduos sólidos através da seleção, utilização e/ou estímulo de populações microbianas específicas presentes em reatores de digestão anaeróbia.

Diante dos estudos envolvendo abordagens moleculares que permitem a identificação bacteriana em processos de digestão anaeróbia, particularmente as espécies responsáveis pela produção de metano via arqueas metanogênicas, identificar quais os grupos e espécies bacterianas envolvidas no processo de digestão anaeróbia de resíduos orgânicos vegetais, utilizando lodo anaeróbio de esgoto como inóculo do substrato, adquire significância no cenário de pesquisas, haja vista que um maior entendimento desses processos - e, por conseguinte, a otimização de cada fase microbiológica - pode contribuir para acelerar o tempo de estabilização da matéria orgânica putrescível, maior produção de gás para o aproveitamento energético e ainda, produzir um biossólido passível de reuso em atividades agrícolas. Por isso, o uso de avançadas técnicas moleculares pode ajudar ainda mais na melhoria da eficiência deste sistema através da identificação da estrutura da comunidade microbiana e função, e suas relações ecológicas na biorreator (KHALID *et al.*; 2011).

Assim, o objetivo desse trabalho consiste em realizar um estudo da diversidade microbiológica envolvendo arqueas metanogênicas nos processos digestão anaeróbia em resíduos sólidos orgânicos, utilizando lodo de UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) como inóculo, de modo a identificar as espécies bacterianas presentes e dominantes no processo de digestão anaeróbia do substrato, em especial na fase metanogênica.

2 Material e Métodos



O trabalho experimental foi realizado nas dependências da Estação Experimental de Tratamentos Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES), na cidade de Campina Grande-PB, Nordeste do Brasil. A fração orgânica putrescível dos resíduos sólidos urbanos utilizada neste trabalho foi proveniente do descarte de resíduos vegetais coletados na Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas, na cidade de Campina Grande – PB. Além dessa fração orgânica, foi utilizado como inóculo lodo anaeróbico proveniente de reator UASB, coletado da Estação Experimental de Tratamentos Biológico de Esgotos Sanitários (EXTRABES).

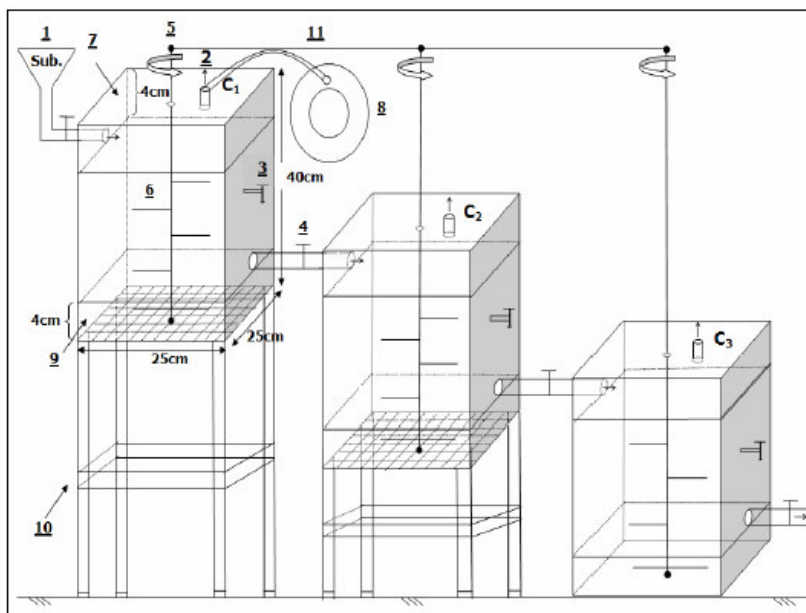
O sistema experimental foi constituído por um reator anaeróbico compartimentado de mistura completa. O mesmo foi construído com três câmaras de reação, em forma de caixas retangulares de bases quadradas, construídas com placas de vidro de 8 mm de espessura e assentado em uma estrutura metálica regulável. Cada câmara apresenta as seguintes dimensões: 40 x 25 x 25 cm (altura *versus* largura *versus* comprimento, respectivamente). As câmaras apresentam volumes unitários de 25 L, sendo um volume de aproximadamente 20 L destinado à câmara de reação e os 5 L remanescentes na parte superior que constitui o *head-space*, destinado ao armazenamento do biogás gerado. O reator foi assentado na estrutura suporte em desnível e as câmaras de reação foram conectadas pelos pontos de transferência de substrato, de modo que, a transferência do conteúdo de cada câmara foi realizada por gravidade, conforme pode ser verificado na Figura 1.

Em cada câmara foram estudadas separadamente as fases da digestão anaeróbia, onde objetivou-se identificar em cada fase de decomposição anaeróbia dos RSO as espécies microbianas presentes e o comportamento das principais espécies envolvidas na decomposição anaeróbia, através das abordagens moleculares.

Para extração de DNA foi utilizado o kit PowerSoil® DNA Isolation Kit - MO BIO Laboratories, onde 0,5 g da amostra centrifugada foi pesada e extraída de acordo com o protocolo do fabricante. A partir do DNA genômico extraído da amostra, foram obtidos fragmentos do RNAr 16S, utilizando a técnica de PCR para amplificação dos fragmentos de DNA (KAPA Taq PCR kit - Kapabiosystems). Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas à amplificação específica dos genes que codificam a região 16S do RNA ribossomal (DNAr 16S) de arqueas. Para a amplificação, foram utilizados o par de iniciadores ou *primers*: *primer foward* ARCH 21F e o *primer reverse* ARCH 1041R e na segunda PCR (nested), foram utilizados o par de iniciadores: *primer foward* PARCH 344F-GC e *primer reverse* UNIV522R. O programa de amplificação adotado para produtos de PCR foi modificado várias vezes. As condições que ofereceram melhores resultados de amplificação

consistiam das seguintes etapas: 2 minutos a 95°C (desnaturação inicial); 35 ciclos de 30 segundos a 94° (desnaturação), 30 segundos a 52°C (anelamento) e 1 minuto e 30 segundos a 72°C (extensão); e, finalmente, 5 minutos a 72° C (extensão final).

Figura 1 – Ilustração do reator anaeróbico compartimentado utilizado para o desenvolvimento da pesquisa.



Os produtos de PCR obtidos a partir das amostras foram submetidos à eletroforese vertical em gel de gradiente desnaturante (DGGE). A solução do gel foi feita segundo protocolo de *Muyzer e colaboradores*. (1996). Alguns testes foram feitos a fim de se obter um gradiente que oferecesse a melhor separação dos fragmentos de DNA contidos nos produtos de PCR (entre 40 a 80%). Para formação de 25,1 mL de gel, utilizou-se duas soluções denominadas de *low* (com baixa porcentagem de desnaturante) e *high* (com alta porcentagem de desnaturante). Antes das soluções *low* e *high* serem misturadas e de ser confeccionado o gel com o gradiente desnaturante desejado, eram adicionados na solução 40% e 65%, 100 µL de APS e 45 µL de TEMED (C₆H₁₆N₂ – Sigma electrophoresis reagent).

O gel foi montado utilizando-se o aparato *DCode™ System Bio Rad*. No presente trabalho, o gradiente escolhido para a confecção dos géis de DGGE foi o de 40 a 65%.

Um pouco da solução 0% foi utilizada na formação dos “poços” ou canaletas para aplicação dos produtos de PCR. Foram aplicados 10 a 30µL de produto de PCR das amostras, dependendo da concentração da amostra. A “corrida” ao longo do gel se processou a 60°C e 80 V, em cerca de 7 L de tampão TAE 0,5X, durante aproximadamente 17 horas.



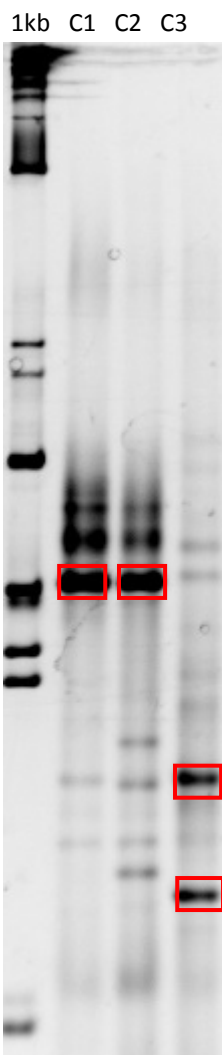
Ao final da eletroforese, o gel foi corado por 20 minutos em solução contendo 60 μL de gel red concentrado, 200 μL de água deionizada e 4 μL de NaCl 5M e visualizado sob luz ultravioleta. Imagens do gel foram documentadas usando um sistema de captura digital de imagem (*Launch Doc ITLS – UVP*, versão 5.0). As bandas de interesse foram excisadas e introduzidas em tubos do tipo *ependorf* contendo 50 μL de água ultrapura estéril, que foram agitados em microdesmembrador a 4.800 rpm durante 3 minutos e armazenados a 4° C (*overnight*). Após este período, os tubos foram centrifugados a 2.800 rpm por 3 minutos e o sobrenadante, contendo os fragmentos de DNA, foi coletado e armazenado em microtubos a –20°C. Testes preliminares de PCR foram realizados com alíquotas variadas dos fragmentos extraídos do gel (1 a 10 μL), diluídos ou não, no intuito de se obter uma amplificação intensa, mas sem “rastros” (bandas inespecíficas). Novos produtos de PCR foram “corridos” em DGGE para verificação da pureza das bandas. Algumas tiveram que ser novamente submetidas à excisão e purificação.

Seguindo a preparação das amostras para sequenciamento, as bandas purificadas dos géis de DGGE foram reamplificadas com o mesmo par de *primers* citado anteriormente, porém sem a “cauda” GC. O programa de ciclos de PCR adotado foi: 2 minutos a 95°C (desnaturação inicial); 40 ciclos de 30 segundos a 94° (desnaturação), 30 segundos a 52°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão); e, finalmente, 5 minutos a 72° (extensão final). Cerca de 90 μL de produtos de PCR de cada banda extraída foram novamente purificados utilizando-se o kit *Wizard DNA Clean-Up System (Qiagen)*. Os produtos de PCR das bandas, uma vez purificados e quantificados, foram enviados para sequenciamento no núcleo de biologia aplicada da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG.

3 Resultados e Discussão

Na Figura 2 apresenta-se a imagem do gel de DGGE obtido após as análises, com as bandas referentes às arqueas identificadas em vermelho, as quais foram excisadas e eluídas:

Figura 2 – Bandas do Gel de DGGE obtido após PCR das amostras de cada câmara do reator anaeróbio.



Legenda: C1: câmara 01 (hidrólise); C2: câmara 02 (acidogênese/acetogênese); C3: câmara 03 (metanogênese); 1Kb: marcador de peso molecular.

Os fragmentos parciais do gene 16S rRNA das bandas selecionadas nos perfis de DGGE, quatro bandas de arqueas, foram sequenciadas, e filiações foram determinadas por comparação com a do Genbank, após purificação e sequenciamento das bandas, conforme dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados das arqueas encontradas após purificação e sequenciamento das bandas do gel de DGGE.

Banda	Identificação	E-value	% similaridade
1	Uncultured <i>Methanobacteriaceae archaeon</i>	1e-43	90
2	Uncultured archaeon	2e-52	94
3	Uncultured <i>Methanobrevibacter sp.</i>	2e-42	91
4	Uncultured <i>Methanosarcinales archaeon</i>	4e-59	97



A partir dos resultados obtidos, a arqueia presente na câmara 01 do reator consiste em uma não-cultivável da família *Methanobacteriaceae*. Em estudos publicados por Griffin e colaboradores (1998), arqueias dessa família foram descritas como as metanogênicas hidrogenotróficas mais abundantes em dois reatores de bancada anaeróbios de mistura contínua, a 37°C e 55° C, inoculados com lodo de esgoto e esterco bovino e alimentados com uma mistura de resíduos sólidos urbanos. Tal achado assemelha-se ao tipo de reator objeto do presente estudo, uma vez que o lodo também é utilizado como inóculo do substrato constituído pela fração orgânica putrescível de RSO (20:80, respectivamente). A presença de membros da família *Methanobacteriaceae*, como por exemplo, *Methanobrevibacter* e *Methanothermobacter thermautotrophicus* representam as metanogênicas hidrogenotróficas (produzem metano a partir do formiato, H₂ e CO₂), contribuindo para a produção de biogás (IKE et al., 2010).

A banda 2, presente na câmara 2 do reator apresenta uma arqueia não cultivável, descrita por Deng e colaboradores (2012). Nesse estudo foi feita a análise da composição da comunidade microbiana em reatores em série, com a finalidade de tratar esgotos com altos níveis de antibióticos. Sabendo que tais contaminantes emergentes estão cada vez mais presentes em águas residuárias, e que o lodo utilizado no presente trabalho é proveniente de um reator tipo UASB alimentado com esgoto doméstico da cidade, assemelha-se assim aos presente trabalho.

Por fim, as últimas bandas são vistas na câmara 03, onde se espera que a etapa metanogênica seja predominante no processo. Para essa fase, foram encontradas não cultiváveis *Methanobrevibacter sp.* e Methanosarcinales (bandas 3 e 4, respectivamente). A primeira, hidrogenotrófica, é citada por Mertoglu e colaboradores (2007) em estudos envolvendo a diversidade metanogênica de Archaea em um biorreator (aterro) aerado preenchido com cinzas residuais de incineração, co-dispostos com resíduos incombustíveis, sendo monitorado e analisado em função de tempo, utilizando técnicas moleculares. O estudo baseado na PCR revelou uma grande diversidade na população metanogênica dentro dos aterros sanitários e identificados elevadas concentrações de hidrogênio utilizando pelos microrganismos metanogênicos, em comparação com as espécies acetoclástica em ambas as amostras de aterro jovens e maduros. Ainda, de acordo com estudos de Ike e colaboradores (2010), *Methanobrevibacter* é dominante na metanogênese.

A arqueia da ordem Methanosarcinales, encontrada também na câmara 03, é descrita em estudos de Yi e colaboradores (2014), onde os resíduos biológicos e de lodo de esgoto foram co-digeridos num reator de digestão anaeróbia (30% e 70% do peso úmido total,



respectivamente), com vistas a identificar a produção de biogás e composição da comunidade árquea metanogênica no reator de digestão anaeróbia em processos meso-termofílicos (35-37°C e 55-57°C). Os resultados mostraram que uma maior quantidade de biogás foi produzida com todas as taxas de carga orgânica no processo termofílico. Ambos os processos apresentaram diversidade limitada da comunidade árqueas metanogênicas que foi dominado por *Methanobacteriales* e *Methanosarcinales* (por exemplo, *Methanosarcina*) em ambos os processos meso e termofílicos. *Methanothermobacter* foi detectado como um gênero dominante adicional no processo termofílico (YI et al., 2014).

Ainda segundo Lv e colaboradores, (2015), constataram que a metanogênese acetoclástica seja a via bioquímica dominante na degradação de palmitato em presença de sulfato. Sabe-se que ácidos graxos de cadeia longa (AGCLs) são intermediários importantes na degradação anaeróbica de n-alcanos. A fim de descobrir os processos bioquímicos envolvidos na degradação de AGCL, palmitato (AGCL um típico) foi utilizado como um substrato, e fluidos de produção do campo petrolífero a baixa temperatura foram utilizados como uma fonte de microrganismos para estabelecer dois sistemas anaeróbios, uma com adição de sulfato como acceptor de elétrons exógeno (SP), outro acceptor de elétrons sem exógeno (MP), ambos incubados à temperatura ambiente. Os resultados mostraram que a metanogênese acetoclástica pode ser a via bioquímica predominante de geração de metano em culturas de enriquecimento alterado com sulfato. Estes resultados lançam luz em vias metanogênicas alternativas na presença de sulfato. Infere-se então, de tal comparação, a necessidade do estudo das vias de degradação presentes no reator em estudo, de modo a se observar se comportamento semelhante é visto durante as etapas de conversão dos AGCL.

4 Conclusões

Após os resultados das análises moleculares, a árquea presente na câmara 01 do reator (fase hidrolítica) consiste em uma não-cultivável da família *Methanobacteriaceae*. A banda 2, presente na câmara 2 do reator (fase acidogênica/acetogênica) apresenta uma árquea não cultivável, encontrada em esgotos com altos níveis de antibióticos. As últimas bandas são vistas na câmara 03 (fase metanogênica em predominância), onde foram encontradas não cultiváveis *Methanobrevibacter sp.* e *Methanosarcinales*, sendo a primeira hidrogenotrófica e a segunda, acetoclástica.



5 Agradecimentos/ Apoio financeiro

Agradecimentos especiais à Embrapa Milho e Sorgo – Núcleo de Biologia Aplicada (Sete Lagoas – MG), à Universidade Estadual da Paraíba e à Universidade Federal de Campina Grande – PB.

Referências

ALVARADO, A.; MONTAÑEZ-HERNÁNDEZ, L.E.; PALACIO-MOLINA, S.L.; OROPEZA-NAVARRO, R.; LUÉVANOS-ESCAREÑO, L.P.; BALAGURUSAMY, N. **Microbial trophic interactions and mcrA gene expression in monitoring of anaerobic digesters.** *Frontiers in microbiology*, v. 5, 197, 2014.

CHARLES, W.; WALKER, L.; CORD-RUWISCH, R. **Effect of pre-aeration and inoculum on the start-up of batch thermophilic anaerobic digestion of municipal solid waste.** *Bioresour. Technol.* **100**, 2329–2335, 2009.

DENG, Y.; ZHANG, Y.; GAO, Y.; LI, D.; LIU, R.; ZHANG, H.; HU, B.; YU, T.; YANG, M.. **Microbial community compositional analysis for series reactors treating high level antibiotic wastewater.** *Environmental Science and Technology*, v. 46, n. 2, p. 795–801, 2012.

GRIFFIN, M. E.; MCMAHON, K.D.; MACKIE, R.I.; RASKIN, L. **Methanogenic population dynamics during start-up of anaerobic digesters.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1998.

IKE, M.; INOUE, D.; MIYANO, T.; LIU, T.T.; SEI, K.; SODA, S.; KADOSHIN, S. **Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Kyoto eco-energy project.** *Bioresource Technology*, v. 101, n. 11, p. 3952–3957, 2010.

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

LV, L.; MBADINGA, S. M.; WANG, L.; LIU, J.; GU, J. MU, B. YANG, S. **Acetoclastic methanogenesis is likely the dominant biochemical pathway of palmitate degradation in the presence of sulfate.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 18, p. 7757–7769, 2015.



MEESAP, K.; BOONAPATCHAROEN, N.; TECHKARNJANARUK, S.; CHAIPRASERT, P. **Microbial Communities and Their Performances in Anaerobic Hybrid Sludge Bed-Fixed Film Reactor for Treatment of Palm Oil Mill Effluent under Various Organic Pollutant Concentrations.** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p. 1-11, 2012.

MERTOGLU, B. et al. Effects of insufficient air injection on methanogenic Archaea in landfill bioreactor. **Journal of Hazardous Materials**, v. 142, n. 1-2, p. 258–265, 2007.

MONTERO, B.; GARCÍA-MORALES, J. L.; SALES, D.; SOLERA, R. **Analysis of methanogenic activity in a thermophilic-dry anaerobic reactor: use of fluorescent in situ hybridization.** *Waste Manag.* 29, 1144–1151, 2009.]

MUYZER, G.; HOTTENTRAGER, S.; TESKE, A.; WAWER, CATHRIN. **Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities.** *Molecular Microbial Ecology Manual*, v. 3.44, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1996.

NELSON, M.C.; MORRISON, M.; YU, Z. **A meta-analysis of the microbial diversity observed in anaerobic digesters.** *Bioresour.Technol.* 102, 3730–3739, 2011.

PARK, C.; LEE, C.; KIM, S.; CHEN, Y.; CHASE, H.A. **Upgrading of anaerobic digestion by incorporating two different hydrolysis processes.** *J. Biosci. Bioeng.* 100, 164–167, 2005.

SANTOS, M. T. L. **Contribuição Para o Estudo da Digestão Anaeróbia de Resíduos Orgânicos.** Lisboa, Portugal, 203 p. Dissertação (Mestrado) em Engenharia Sanitária. Universidade de Nova Lisboa, Portugal, 2010.

SHIN, S.G.; HAN, G.; LIM, J.; LEE, C.; HWANG, S. **A comprehensive microbial insight into two-stage anaerobic digestion of food waste-recycling wastewater.** *Water Res.* 44, 4838–4849, 2010.

SUPAPHOL, S.; JENKINS, S. N.; INTOMO, P.; WAITE, I. S.; O'DONNELL, A. G. **Microbial community dynamics in mesophilic anaerobic co-digestion of mixed waste.** *Bioresour.Technol.* 102, 4021–4027, 2011.

YI, J.; DONG, B.; XUE, Y.; LI, N.; GAO, P.; ZHAO, Y.; DAI, L.; DAI, X. **Microbial Community Dynamics in Batch High-Solid Anaerobic Digestion of Food Waste Under Mesophilic Conditions.** *J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2), 270–279, 2014.