UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO DA NATUREZA

Amanda Meirelles de Sá Janiques

Diversidade de bactérias e arqueias em camas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: ciclagem de nutrientes e emissão de gases de efeito estufa

Diversity of bacteria and archaea in bedding for compost barn: nutrient cycling and greenhouse gas emissions

Juiz de Fora
2024

Amanda Meirelles de Sá Janiques

Diversidade de bactérias e arqueias em camas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: ciclagem de nutrientes e emissão de gases de efeito estufa

Diversity of bacteria and archaea in bedding for compost barn: nutrient cycling and greenhouse gas emissions

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Ecologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dioneia Evangelista Cesar

Coorientadora: Profa. Dra. Julliane Dutra Medeiros

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Janiques, Amanda Meirelles de Sá.
Diversidade de bactérias e arqueias em camas de criação de vacas leiteiras do tipo Compost Barn: ciclagem de nutrientes e emissão de gases de efeito estufa / Amanda Meirelles de Sá Janiques. -- 2024.
96 p. : il.

Orientadora: Dioneia Evangelista Cesar
Coorientadora: Julliane Dutra Medeiros
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2024.

1. Ecologia microbiana. 2. Biodiversidade. 3. Compost barn. I. Cesar, Dioneia Evangelista, orient. II. Medeiros, Julliane Dutra, coorient. III. Título.

Amanda Meirelles de Sá Janiques

Diversidade de bactérias e arqueias em camas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: ciclagem de nutrientes e emissão de gases de efeito estufa

Diversity of bacteria and archaea in bedding for compost barn: nutrient cycling and greenhouse gas emissions

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação da Natureza. Área de concentração: Ecologia.

Aprovada em 25 de novembro de 2024

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dioneia Evangelista Cesar - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Julliane Dutra Medeiros - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Alessandra Barbosa Ferreira Machado
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles
Universidade Federal de Lavras

Documento assinado eletronicamente por Dioneia Evangelista Cesar, Professor(a), em 29/11/2024, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por Julliane Dutra Medeiros, Professor(a), em 29/11/2024, às 15:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por Elaine Maria Seles Dorneles, Usuário Externo, em 29/11/2024, às 16:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por Alessandra Barbosa Ferreira Machado, Professor(a), em 29/11/2024, às 16:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por Amanda Meirelles de Sá Janiques, Usuário Externo, em 02/12/2024, às 11:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 2048191 e o código CRC 143FE86D.

Àqueles que são os maiores responsáveis por essa conquista, meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por me acompanhar durante esses anos, me sustentando e ajudando nos momentos mais desafiadores e celebrando comigo nas alegrias.

À minha família, em especial aos meus pais, que são minha base e minha inspiração. Vocês sempre trabalharam duro, muitas vezes renunciando aos próprios sonhos, e por isso, tenho a sorte de ter tido a oportunidade de fazer do estudo minha maior prioridade. Prometo retribuir todo esse esforço, e enchê-los de orgulho em cada conquista da minha vida. Vocês são a razão de tudo.

À minha irmã, por ser minha amiga e companheira em muitos momentos. Obrigada por cada palavra de incentivo, por me ouvir nos dias difíceis e por estar ao meu lado, oferecendo seu apoio. Sua presença, mesmo nas pequenas coisas, fez toda a diferença nessa jornada.

Ao Jorge, que foi companhia em todos os momentos deste processo, me trazendo alegria e conforto nos momentos felizes e nos desafiadores. À Belinha, que deixou um amor imenso em meu coração e uma saudade eterna.

Ao Arthur, que esteve sempre comigo em cada passo dessa caminhada. Seu companheirismo, apoio constante e amor foram fundamentais para que eu prosseguisse com confiança e coragem até alcançar essa conquista.

À Dioneia, minha orientadora e eterna professora de vida, pela paciência, apoio e cada conselho oferecido com tanta generosidade e por acreditar no meu potencial quando nem eu mesma acreditava.

À Julliane, minha coorientadora, pela grata surpresa em uma orientação realizada com tamanha leveza, competência e dedicação. Seu comprometimento e didática me inspiram além da ciência.

A todos do Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos (LEBIOMM) pelo apoio diário, na realização deste trabalho, nas FISHs e, principalmente, pela amizade. Em especial, à Fernanda, pelo carinho indescritível e profissionalismo impecável.

Aos meus amigos, pelo apoio, risadas e paciência durante todo processo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza pelo auxílio, esclarecimentos e oportunidades para que eu finalizasse minha dissertação.

Aos meus professores de graduação e pós-graduação pelo auxílio e apoio nesses últimos sete anos.

Às professoras Dra. Alessandra Machado e Dra. Elaine Dorneles por gentilmente aceitarem compor a banca da minha dissertação e contribuírem com seus conhecimentos na avaliação deste trabalho.

À Embrapa Gado de Leite, ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais e a todos os colaboradores que auxiliaram nas coletas e em quaisquer outras etapas que permitiram a conclusão deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal de Juiz de Fora (PBPG) pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

Microrganismos são os seres vivos mais diversos do planeta e muitos ainda desconhecidos, ou não classificados. Na cama de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn* (CB) não é diferente. Neste trabalho avaliamos a diversidade de procariotos (bactérias e arqueias), nas camas de várias fazendas de criação de vacas leiteiras do tipo CB. Primeiro, analisamos a estrutura e dinâmica da comunidade de bactérias nitrificantes em camas de duas fazendas no sul de Minas Gerais/MG com diferentes tempos de instalação e funcionamento: uma cama em etapa de sucessão inicial e outra madura. As densidades de bactérias oxidadoras de amônia e nitrito, quantificadas pela técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), foram diferentes nas camas das duas fazendas ao longo do tempo. Essas bactérias ligadas ao ciclo de nitrogênio participam de uma interação complexa entre microrganismos e componentes abióticos dos sistemas. O segundo trabalho foi realizado em um sistema do tipo CB da Fazenda Experimental da EMBRAPA Gado de Leite em Coronel Pacheco/MG. A densidade de bactérias das ordens Methanosarcinales e Methanobacteriales foi avaliada, também pela técnica de FISH, na cama deste sistema ao longo do tempo. O papel da passagem do trator na densidade destas arqueias metanogênicas e sua distribuição em diferentes profundidades da cama também foi avaliado. E, ainda, relacionamos essas densidades com as concentrações de metano medidas antes e após a aeração realizada pela passagem do trator. Nos primeiros meses após instalação da cama e após a passagem do trator, foi observado maior variação nas densidades destas arqueias. As densidades das arqueias foram dez vezes maiores após 18 meses de funcionamento do sistema. Na primeira coleta, durante a instalação da cama, foram encontradas as menores densidades e proporção de Methanosarcinales. Após aeração e homogeneização do tamanho das partículas pelo trator, foi observado maior número de arqueias Methanobacteriales nas duas profundidades amostradas. Por fim, no terceiro trabalho, a diversidade bacteriana foi avaliada através sequenciamento do gene 16S rRNA de amostras de cama de cinco fazendas de Minas Gerais/MG e uma de Goiás/GO, com diferentes tipos de material da cama, tamanho do sistema, número de vacas por área, idade da cama, quantidade de nutrientes e gases de efeito estufa produzido durante as coletas. As camas apresentaram microbiotas distintas, com diversas sequências variantes de *amplicons* (ASVs) sem assinatura taxonômica a nível de família e gênero. ASVs foram diferencialmente abundantes em baixo fluxo de metano produzido e outras em alto fluxo deste gás. Portanto, torna-se fundamental o estudo sobre o sistema CB, suas vantagens e potenciais impactos, a fim de aumentar o

entendimento sobre este sistema e identificar estratégias capazes de influenciar na tomada de decisão para alternativas sustentáveis.

Palavras-chave: Compostagem; bactérias nitrificantes; arqueias metanogênicas; sequenciamento genético; manejo.

ABSTRACT

Microorganisms are the most diverse living beings on the planet and many are still unknown or unclassified. It is no different in the bedding of compost barn (CB) dairy farming systems. In this study, we evaluated the diversity of prokaryotes (bacteria and archaea) in the bedding of various CB dairy farms. Firstly, we assessed the structure and dynamics of the nitrifying bacteria community in the litter of two farms in the south of Minas Gerais/MG with different installation and operating times: one in the early succession stage and the other mature. The densities of ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, quantified by the fluorescent in situ hybridization (FISH) technique, were different in the beds of the two farms over time. These bacteria linked to the nitrogen cycle participate in a complex interaction between microorganisms and abiotic components of the systems. The second study was carried out in a CB system at the Experimental Farm EMBRAPA Dairy Cattle in Coronel Pacheco/MG. The density of bacteria from the orders Methanosarcinales and Methanobacteriales was assessed, also using the FISH technique, in the bedding of this system over time. The role of the tractor on the density of these methanogenic archaea and their distribution at different depths of the bed was also assessed. We also related these densities to the methane concentrations measured before and after aeration by the tractor. In the first few months after the bed was installed and after the tractor had passed through, there was greater variation in the densities of these archaea. The densities of the archaea were ten times higher after the system had been in operation for 18 months. The lowest densities and proportions of Methanosarcinales were found in the first collection, during bed installation. After aeration and homogenization of the particle size by the tractor, a greater number of Methanobacteriales were observed at both sampling depths. Finally, in the third study, bacterial diversity was assessed by sequencing the 16S rRNA gene in bedding samples from five farms in Minas Gerais/MG and one in Goiás/GO, with different types of bedding material, system size, number of cows per area, bedding age, amount of nutrients and greenhouse gases produced during collection. The bedding from each farm presented a distinct bacterial community, with many amplicon sequence variants (ASVs) without a taxonomic signature at family level. Some bacteria were found in low methane flows and others in high methane emissions. Therefore, it is essential to study the CB system, its advantages and potential impacts, in order to increase understanding of this system and identify strategies capable of influencing decision-making towards sustainable alternatives.

Keywords: Composting; nitrifying bacteria; methanogenic archaea; genetic sequencing; management.

RESUMO PARA DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

Diversidade é considerada grande quando um ambiente possui muitas espécies e/ou número parecido de indivíduos de cada uma dessas espécies. As camas de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo "*compost barn*" possuem uma grande diversidade de microrganismos. Eles são responsáveis pelo bom funcionamento destes sistemas. A quantidade e o tipo de microrganismos variam com o tempo e lugar. Nosso trabalho avaliou a diversidade de microrganismos nas camas de várias fazendas de produção de leite. Primeiro, avaliamos a quantidade de bactérias que participam do ciclo do nitrogênio em duas fazendas no sul de Minas Gerais: uma recém-instalada e outra com mais de um ano de funcionamento. Além da quantidade destas bactérias na cama mudarem com o tempo, há também a modificação na quantidade dos tipos de nutrientes processados por elas. O entendimento destas mudanças é importante, principalmente para posterior utilização do composto na adubação. O segundo trabalho foi realizado na Fazenda Experimental da EMBRAPA Gado de Leite, em Coronel Pacheco/MG. Avaliamos a quantidade de microrganismos que produzem metano, isto é, alguns grupos das chamadas arqueias, ao longo do tempo. Avaliamos, também, o papel da passagem do trator na quantidade e distribuição destas arqueias na cama. E, ainda, relacionamos essas quantidades com as quantidades de metano medidas antes e após a mistura da cama pelo trator. Os resultados mostraram a importância de um manejo adequado, inclusive para minimizar a produção dos gases de efeito estufa. Por fim, comparamos as bactérias da cama de cinco fazendas de Minas Gerais/MG e uma de Goiás/GO com diferentes tipos de material da cama, tamanho do curral, número de vacas por área, idade da cama, quantidade de nutrientes e gases de efeito estufa produzidos durante as coletas. A cama de cada fazenda apresentou uma comunidade de bactérias própria, com muitas ainda não identificadas. Algumas bactérias aparecem em grande número em baixa quantidade de metano produzido e outras em grande emissão deste gás. Conhecer quais e quantos microrganismos estão presentes nas camas de sistemas de "*compost barn*" pode ajudar a escolher melhores práticas de manejo, que resultarão na saúde e bem-estar das vacas e um ambiente mais sustentável.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 **Distribuição espacial e sucessão ecológica em camas de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: ciclagem de nitrogênio e bactérias envolvidas**

Figura 1 – Análise de componentes principais (PCA), de dados logaritmizados, com a distribuição e variação das bactérias separadamente (A) e somente AOB e NOB agrupadas (B) nas Fazendas 1 (pontos vermelhos) e 2 (pontos azuis) coletadas espacialmente em três profundidades 22

Figura 2 – Densidades e proporções de bactérias oxidantes de amônia (AOB), *Nitrobacter*, Nitrospirae e *Pseudomonas fluorescens* nas camadas superficial (0 a 10 cm), intermediária (10 a 20 cm) e inferior (20 a 30 cm) das camas de CB das Fazendas 1 (A e C) e 2 (B e D). Os dados são apresentados como médias com barras indicando o desvio padrão 23

Figura 3 – Análise de componentes principais (PCA) de dados logaritmizados destacando a distribuição e separação entre as Fazendas 1 (pontos vermelhos) e 2 (pontos azuis), considerando os fatores químicos das amostras coletadas na superfície 24

Figura 4 – Análise de componentes principais (PCA) de dados químicos logaritmizados destacando a distribuição e variabilidade das amostras coletadas temporalmente na superfície da Fazenda 2. Os tempos T0 a T4 correspondem, respectivamente, à implementação do sistema e ao primeiro, terceiro, sexto e décimo segundo mês após..... 25

Figura 5 – Correlação de Pearson entre densidade e proporção dos grupos bacterianos com a razão C:N e Nitrogênio total para todas as amostras coletadas na Fazenda 2 temporalmente 26

Figura 6 – Densidade (A) e proporção (B) (média ± desvio padrão) de bactérias ligadas ao ciclo do nitrogênio coletadas temporalmente (T0 = instalação do sistema; T1, T2, T3 e T4 = um mês, três meses, seis meses e doze meses, respectivamente, após a instalação do sistema 27

Capítulo 2 **Arqueias metanogênicas em cama de sistema de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: heterogeneidade e manejo**

Figura 1 – Densidade média e erro padrão (10^8 cél g^{-1}) de arqueias metanogênicas das ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales na superfície da cama em três pontos de cada lote (L1, L2, L3, L4) durante dois meses de funcionamento do sistema 50

Figura 2 – Proporção média e erro padrão (barras) da densidade Methanobacteriales e Methanosarcinales em relação ao total de procariotos ao longo do tempo. Os pontos representam os valores observados em cada amostra. Áreas sombreadas ao redor das linhas representam o intervalo de confiança de 95% 51

Figura 3 – Densidade de arqueias das ordens Methanobacteriales (A) e Methanosarcinales (B) nas profundidades de 20 cm e 40 cm, antes e depois do revolvimento da cama com 18 meses de instalação do sistema. Caixas representam o intervalo interquartil, linha central representa a mediana e pontos representam os outliers..... 52

Figura 4 – Proporção de Methanobacteriales (A) e Methanosarcinales (B) nas profundidades de 20 cm e 40 cm, antes e depois do revolvimento da cama com 18 meses de instalação do sistema. Caixas representam o intervalo interquartil, linha central representa a mediana e pontos representam os outliers 53

Figura 5 – Matriz de correlação entre valores médios da densidade de arqueias metanogênicas (ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales), e valores médios do fluxo de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) na superfície da cama antes e após o revolvimento 54

Capítulo 3 Microbioma de camas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: diversidade bacteriana e relação com fluxo de metano

Figura 1 – Curvas de rarefação das amostras em função do número de sequências variantes de *amplicons* (ASVs) do gene 16S rRNA e o número de sequências obtidas pelo sequenciamento 72

Figura 2 – Análise da diversidade alfa nas seis fazendas (F1 a F6). Chao1 (A) foi utilizado como estimador de riqueza, Shannon (B) como estimador de diversidade e Simpson como estimador de dominância (C) 73

Figura 3 – Análise da diversidade beta das amostras das camas das seis fazendas (F1 a F6). O gráfico de escala multidimensional (NMDS) baseou-se na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. As triplicatas são representadas pela mesma cor dentro de cada fazenda 74

Figura 4 – Boxplot de abundância relativa (%) a nível de filo da microbiota nas amostras de cama das seis fazendas (F1 a F6) 75
Figura 5 – Gráfico de barras de abundância relativa (%) a nível de família 76
Figura 6 – Gráfico de barras de abundância relativa (%) a nível de gênero considerando as ASVs não atribuídas a nível de gênero 77
Figura 7 – Abundância diferencial de ASVs entre fazendas com alto e baixo fluxo de metano. Boxplots representam a distribuição da abundância de diferentes táxons microbianos em dois grupos: alto fluxo de metano (High) e baixo fluxo de metano (Low) 78

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 **Distribuição espacial e sucessão ecológica em camas de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: ciclagem de nitrogênio e bactérias envolvidas**

Tabela 1 – Sondas específicas utilizadas para análise da composição da comunidade de bactérias do ciclo do nitrogênio espacialmente nas Fazendas 1 e 2 e temporalmente na Fazenda 2 20

Capítulo 2 **Arqueias metanogênicas em cama de sistema de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: heterogeneidade e manejo**

Tabela 1 – Sondas específicas utilizadas para análise da composição da comunidade de arqueias metanogênicas e concentração de formamida na solução de hibridização 48

Tabela 2 – Valores descritivos e de dispersão das densidades de arqueias das ordens Methanobacteriales (MB) e Methanosarcinales (MS) em amostras da cama coletadas quinzenalmente por dois meses 49

Capítulo 3 **Microbioma de camas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: diversidade bacteriana e relação com fluxo de metano**

Tabela 1 Caracterização do CB das fazendas amostradas 70

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL 13

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 14

2 CAPÍTULO 1: DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E SUCESSÃO ECOLÓGICA EM CAMAS DE SISTEMAS DE CRIAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DO TIPO *COMPOST BARN*: CICLAGEM DE NITROGÊNIO E BACTÉRIAS ENVOLVIDAS..... 16

2.1 RESUMO 16

2.2 ABSTRACT 16

2.3 INTRODUÇÃO 17

2.4 MATERIAL E MÉTODOS 19

2.5 RESULTADOS 21

2.6 DISCUSSÃO 27

2.7 CONCLUSÃO 34

2.8 AGRADECIMENTOS 34

2.9 FINANCIAMENTO 34

2.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 35

3 CAPÍTULO 2: ARQUEIAS METANOGÊNICAS EM CAMA DE SISTEMA DE CRIAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DO TIPO *COMPOST BARN*: HETEROGENEIDADE E MANEJO 44

3.1 RESUMO 44

3.2 INTRODUÇÃO 45

3.3 MATERIAL E MÉTODOS 47

3.4 RESULTADOS 48

3.5 DISCUSSÃO 54

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 59

4 CAPÍTULO 3: MICROBIOMA DE CAMAS DE CRIAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DO TIPO *COMPOST BARN*: DIVERSIDADE BACTERIANA E RELAÇÃO COM FLUXO DE METANO 68

4.1 RESUMO 68

4.2 INTRODUÇÃO 68

4.3 MATERIAL E MÉTODOS 70

4.3.1 Área de estudo e coleta de amostras 70
4.3.2 Preparação da amostra e extração de DNA 71
4.3.3 Análise de dados da microbiota 71
4.4 RESULTADOS 72
4.4.1 Estrutura e diversidade da comunidade microbiana 72
4.4.2 Composição taxonômica da comunidade microbiana 74
4.4.3 Grupos bacterianos diferencialmente abundantes entre fazendas 77
4.5 DISCUSSÃO 78
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

1. INTRODUÇÃO GERAL

O *compost barn* (CB) é um sistema de confinamento para vacas leiteiras que vem ganhando popularidade mundial devido aos seus benefícios relacionados ao bem-estar animal, gestão ambiental, mão de obra e qualidade do leite (Barberg *et al*., 2007b; Janni *et al*., 2007). O sistema surgiu em Minnesota, Estados Unidos, na década de 1990, e oferece uma alternativa potencialmente sustentável para a produção de leite, já que utiliza material orgânico – como a serragem, para a cobertura da cama, que devido ao processo de compostagem, pode posteriormente ser utilizado como adubo (Barberg *et al*., 2007a; Black *et al*., 2013; Leso *et al*., 2020). Além disso, estes sistemas utilizam matéria orgânica para a compostagem de várias fontes, contribuindo para economia circular (Oliveira *et al*., 2023).

Os microrganismos são os seres mais diversos e abundantes do planeta, apresentados por dois dos três domínios da árvore da vida – Bacteria e Archaea, além de possuírem representantes no domínio Eukarya. São amplamente distribuídos e estão presentes nos mais variados ambientes. Nos sistemas CB, o processo de compostagem da cama é realizado por uma diversidade de microrganismos que desempenham funções variadas e complementares como decomposição, fermentação e transformação de compostos, importantes para o funcionamento do sistema. Esses microrganismos utilizam a matéria orgânica liberando produtos como vapor de água, metano e dióxido de carbono para o ambiente. Desta forma, é necessário a manutenção da cama em condições adequadas de temperatura, umidade e disponibilidade de oxigênio para garantir o crescimento microbiano, a longevidade do sistema e a saúde dos animais (Bewley, *et al*., 2012; Black *et al*., 2013; Fillingham *et al*., 2017; Janni *et al*., 2007; Leso *et al*., 2020)

O equilíbrio entre emissão e consumo de gases é regulado biologicamente pela microbiota. A produção de gases de efeito estufa (GEE) em sistemas de produção leiteiro está intimamente relacionada à presença de microrganismos, como as arqueias metanogênicas, seja de forma entérica por microrganismos anaeróbios ou na cama. Além disso, a emissão de GEE nos setores leiteiros são responsáveis por uma parcela significativa dos valores relacionados à pecuária. Diferentes fatores como manejo, tipo de cama e método de limpeza podem influenciar nas concentrações de gases (Gerber *et al*., 2013; Jayasundara *et al*., 2016; Lobeck et al., 2012; Shane *et al*., 2010).

Esta dissertação foi dividida em três capítulos de acordo com temáticas específicas, conforme descrição abaixo, na tentativa de se aproximar ao máximo de formatações de futuras publicações científicas. Dessa forma, figuras estarão em inglês.

Capítulo 1 - Distribuição espacial e sucessão ecológica em camas de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: ciclagem de nitrogênio e bactérias envolvidas.

Capítulo 2 - Arqueias metanogênicas em cama de sistema de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: heterogeneidade e manejo.

Capítulo 3 - Microbioma de camas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*: diversidade bacteriana e relação com fluxo de metano.

Espera-se que este trabalho possa contribuir para uma melhor compreensão da comunidade microbiana em camas de sistema de produção de vacas leiteiras do tipo *compost barn* e sua relação com emissões de metano nestes sistemas.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barberg, A.E., Endres, M.I., Janni, K.A., 2007a. Compost Dairy Barns in Minnesota: A Descriptive Study. Applied Engineering in Agriculture 23, 231–238. https://doi.org/10.13031/2013.22606

Barberg, A.E., Endres, M.I., Salfer, J.A., Reneau, J.K., 2007b. Performance and Welfare of Dairy Cows in an Alternative Housing System in Minnesota. Journal of Dairy Science 90, 1575–1583. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71643-0

Bewley, J., Taraba, J., Day, G., Black, R., Damasceno, F., 2012. Compost Bedded Pack Barn Design: Features and Management Considerations (No. ID-206), Cooperative Extension Publ. ID-206. Cooperative Extension Service, University of Kentucky College of Agriculture, Lexington, KY, UK.

Black, R.A., Taraba, J.L., Day, G.B., Damasceno, F.A., Bewley, J.M., 2013. Compost bedded pack dairy barn management, performance, and producer satisfaction. Journal of Dairy Science 96, 8060–8074. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6778

Fillingham, M.A., VanderZaag, A.C., Burtt, S., Baldé, H., Ngwabie, N. M., Smith, W., Hakami, A., Wagner-Riddle, C., Bittman, S., & MacDonald, D., 2017. Greenhouse gas and ammonia emissions from production of compost bedding on a dairy farm. Waste management, 70, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.013

Gerber, P.J., Hristov, A.N., Henderson, B., Makkar, H., Oh, J., ..., 2013. Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review. animal.

Janni, K.A., Endres, M.I., Reneau, J.K., Schoper, W.W., 2007. Compost Dairy Barn: Layout and Management Recommendations. Applied Engineering in Agriculture 23, 97–102.

Jayasundara, S., Ranga Niroshan Appuhamy, J.A.D., Kebreab, E., Wagner-Riddle, C., 2016. Methane and nitrous oxide emissions from Canadian dairy farms and mitigation options: An updated review. Can. J. Anim. Sci. 96, 306–331. https://doi.org/10.1139/cjas-2015-0111

Leso, L., Barbari, M., Lopes, M.A., Damasceno, F.A., Galama, P., Taraba, J.L., Kuipers, A., 2020. Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. Journal of Dairy Science 103, 1072–1099. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16864

Lobeck, K.M., Endres, M.I., Janni, K.A., Godden, S.M., Fetrow, J., 2012. Environmental characteristics and bacterial counts in bedding and milk bulk tank of low profile cross-ventilated, naturally ventilated, and compost bedded pack dairy barns. Applied Engineering in Agriculture 28, 117–128.

Oliveira, C.E.A., Tinôco, I.D.F.F., Souza, C.D.F., Baêta, F.D.C., Andrade, R.R., Vieira, F.M.C., Barbari, M., Bambi, G., 2023. Physicochemical Bedding Quality in Compost-Bedded Pack Barn Systems for Dairy Cows: A Systematic Review. Applied Sciences 13, 9832. https://doi.org/10.3390/app13179832

Shane, E.M., Endres, M.I., Johnson, D.G., Reneau, J.K., 2010. Bedding Options for an Alternative Housing System for Dairy Cows: A Descriptive Study. Applied Engineering in Agriculture 26, 659–666. https://doi.org/10.13031/2013.32062

2. CAPÍTULO 1 – DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL E SUCESSÃO ECOLÓGICA EM CAMAS DE SISTEMAS DE CRIAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DO TIPO *COMPOST BARN*: CICLAGEM DE NITROGÊNIO E BACTÉRIAS ENVOLVIDAS.

2.1 RESUMO

As camas dos sistemas de produção leiteira do tipo *compost barn* (CB) são ecossistemas com ciclagem de nutrientes e sucessão ecológica durante o processo de compostagem. Este estudo, realizado em duas fazendas em Minas Gerais, Brasil, investigou a estrutura e a dinâmica da comunidade microbiana composta por microrganismos nitrificantes e desnitrificantes em diferentes profundidades, lotes de vacas e linhas de cama. A estrutura foi analisada por hibridização *in situ* fluorescente com coletas espaciais nas duas fazendas (1 e 2), enquanto a dinâmica foi monitorada ao longo de um ano a partir da instalação e operação de uma das fazendas (Fazenda 2). Comparando as duas fazendas, foi observado que a Fazenda 2 apresentou maiores densidades de bactérias oxidantes de amônia e *Pseudomonas fluorescens* no primeiro mês de compostagem, com aumento nos valores após seis meses. Correlação entre a relação C:N, nitrogênio e procariotos na Fazenda 1 e as bactérias oxidantes de nitrito do filo Nitrospirae na Fazenda 2 foi observada. Concluímos que existe uma grande variabilidade de bactérias nitrificantes e desnitrificantes nas camas dos sistemas de produção CB, mostrando que a ciclagem do nitrogênio é o resultado de uma complexa interação entre esses microrganismos.

Palavras-chave: Compostagem; confinamento leiteiro; nitrificação; desnitrificação; relação C:N; NOB; AOB.

2.2 ABSTRACT

The beds of compost barn (CB) dairy farming systems are ecosystems with nutrient cycling and ecological succession during the composting process. This study, conducted on two farms in Minas Gerais, Brazil, investigated the structure and dynamics of the microbial community composed of nitrifying and denitrifying microorganisms at different depths, cow lots and bed lines. The structure was analyzed by fluorescence in situ hybridization with spatial collections on the two farms, while the dynamics were monitored over the course of a year from the installation and operation of one of the farms (Farm 2). Comparing the two farms, it was observed that Farm 2 had higher densities of ammonia-oxidizing bacteria and *Pseudomonas fluorescens* in the first month of composting, with these numbers increasing further after six months. Correlation between the C:N ratio, nitrogen and prokaryotes on Farm 1 and the nitrite-

oxidizing bacteria of the phylum Nitrospirae on Farm 2 was observed. We conclude that there is a wide variability of nitrifying and denitrifying bacteria in the beds of the CB farming systems, showing that nitrogen cycling is the result of a complex interaction between these microorganisms.

Keywords: Composting; dairy confinement; nitrifiers; denitrifiers; C:N ratio; NOB; AOB.

2.3 INTRODUÇÃO

O sistema de confinamento de gado leiteiro do tipo compost barn (CB) conta com o uso de uma cama constituída por material orgânico, a fim de melhorar a saúde do animal e a produtividade na fazenda. A cama é local de interação entre microrganismos, devido às atividades desempenhadas por eles, o que permite a ciclagem dos materiais ali presentes a partir do processo de compostagem. Além disso, gera compostos que podem ser usados como adubo na agricultura (Barberg *et al*., 2007; Black *et al*., 2013; Sun *et al*., 2016; Leso *et al*., 2020).

A cama de CB pode ser um exemplo de um ecossistema com ambientes de entrada e saída e comunidades microbianas que se desenvolvem num processo de sucessão ecológica. Há uma deposição constante de fezes, urina e resíduos alimentares, que são fontes de nitrogênio e de microrganismos. O processo de compostagem nesses ecossistemas é caracterizado por uma sucessão dinâmica de comunidades de procariotos e fungos (Yamamoto & Nakai, 2019). As populações presentes no material de cama crescem e, ao longo do processo, espécies são substituídas pela entrada e crescimento de outras populações, principalmente via eliminação de urina e fezes das vacas. Neste trabalho utilizamos esta abordagem ecossistêmica.

A relação C:N desempenha um papel crucial na formação da sucessão da comunidade bacteriana durante a compostagem. A relação C:N inicial, com proporções específicas (25:1) aumenta a eficiência e promove as atividades das principais enzimas extracelulares, o que também pode levar a um declínio de patógenos (Qiao *et al*., 2019, 2021). Além disso, razões C:N mais altas podem, ainda, aumentar a abundância de bactérias transformadoras de nitrogênio, reduzindo as perdas de N e C e melhorando a qualidade do composto (Zhang *et al*., 2019). A variabilidade das condições ambientais é muito maior no início do processo do que no final. Por outro lado, a complexidade funcional e estrutural da comunidade é menor no início e maior no final da compostagem. O padrão de sucessão da diversidade bacteriana no composto é caracterizado por um aumento das espécies microbianas ao longo do tempo, com grupos específicos dominando diferentes fases da compostagem (Meng *et al*., 2019). Bactérias e arqueias

nitrificantes desempenham um papel fundamental neste processo de compostagem e de ciclagem de nutrientes.

A ciclagem de compostos nitrogenados é possível pela ação de bactérias heterotróficas e quimioautotróficas, que atuam por meio de diferentes processos. As bactérias heterotróficas incorporam amônia em sua biomassa como proteína, enquanto as bactérias nitrificantes quimioautotróficas transformam a amônia em nitrato, com um estágio intermediário temporário de produção de nitrito. A nitrificação é uma oxidação sequencial, normalmente em duas etapas, mediada por grupos bacterianos distintos. As bactérias oxidantes de amônia (AOB) oxidam a amônia em nitrito, enquanto as bactérias oxidantes de nitrito (NOB) convertem o nitrito em nitrato. No entanto, descobriu-se que algumas espécies de bactérias nitrificantes do gênero Nitrospira poderiam conduzir um processo completo de nitrificação da amônia a nitrato (Daims *et al*., 2015; Van Kessel *et al*., 2015).

A interação complexa entre compostagem e nitrificação, destaca a diversidade funcional dos microrganismos envolvidos no processo, que, como em qualquer ecossistema, não atuam em todos os processos o tempo todo. Algumas espécies afetam significativamente a ciclagem de nutrientes, participando de etapas específicas, enquanto outras podem influenciar mais de uma etapa. No entanto, o processo de nitrificação não está relacionado apenas à atividade das bactérias e arqueias nitrificantes. Procariotos envolvidos no ciclo de nitrogênio podem expressar diferenças fisiológicas e metabólicas devido à presença de diferentes genes como *nifH, nosZ, hzsA, AamoA, BamoA, nxrB e nrfA* (Rose *et al*., 2021), e a expressão destes genes pode ser dependente das densidades de tais grupos e de vários fatores ambientais.

A desnitrificação é um processo conduzido por vários microrganismos, incluindo *Pseudomonas fluorescens*, que transformam nitrato em gás nitrogênio. Este processo é particularmente significativo na compostagem, porque pode levar à perda de nitrogênio e a degradação de importantes produtos (Shi *et al*., 2020). Outros gases, inclusive gases do efeito estufa, como óxido nitroso e metano, são produzidos por microrganismos em camas de sistemas CB. O incremento de compostos nitrogenados no sistema tem relação direta com a emissão de óxido nitroso e oxidação do metano. O amônio inibe a oxidação do metano através da competição entre eles por enzimas mono-oxigenase. Os processos de nitrificação e desnitrificação ocorrem simultaneamente e ambos são importantes no processo de compostagem. Assim, a concentração de compostos nitrogenados no CB é o resultado de todo o processo realizado pelos procariotos nitrificadores e desnitrificadores (bactérias e arqueias), com alguns grupos atuando em ambos os processos.

A técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) tem sido utilizada na quantificação de microrganismos nitrificantes em outros ecossistemas (Del'Duca *et al*., 2019; Lukumbuzya *et al*., 2020; Matturro *et al*., 2021). Neste trabalho, utilizamos esta técnica para comparar a densidade de bactérias que oxidam amônia e nitrito em camas de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo CB em etapas de compostagem distintas — cama logo após a instalação e outra com mais de um ano de funcionamento. A sucessão ecológica da cama de uma destas fazendas também foi avaliada desde a implantação até um ano de funcionamento. Para tanto, foi quantificada a densidade de bactérias envolvidas na ciclagem de nitrogênio.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento amostral foi definido com coletas espacial e temporal em camas de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo CB. Amostragem espacial foi realizada em duas fazendas localizadas nos municípios de Itamonte (Fazenda 1) e Cruzília (Fazenda 2), ambas situadas no sul do estado de Minas Gerais, Brasil. As fazendas possuíam tempos de implementação e funcionamento do sistema distintos. Na Fazenda 1, o sistema já funcionava há mais de um ano, enquanto na Fazenda 2 a implementação ocorreu concomitante à primeira coleta (T0) da amostragem temporal. Nesta fazenda, a coleta espacial aconteceu com 1 mês de compostagem (T1). A amostragem temporal, que aconteceu apenas na Fazenda 2, foi realizada durante um ano desde o início de seu funcionamento. Além das amostragens iniciais (T0 e T1) e final (T4), foram realizadas ainda coletas com 3 e 6 meses de funcionamento (T2 e T3, respectivamente).

Em ambos os sistemas, os animais foram divididos pelos proprietários em lotes com número variável de vacas. Na Fazenda 1 foram agrupadas em: pré e pós-parto (L1), alta produção leiteira (L2), final de lactação (L3) e novilhas (L4). Já na Fazenda 2, o agrupamento foi em alta produção (L1), média produção (L2), pré e pós-parto (L3) e novilhas (L4). Em ambas as fazendas, os sistemas eram abertos e contavam com ventilação mecânica. Os cochos de alimento e de água são localizados em lados opostos, longitudinalmente nos celeiros com 90m em ambas as fazendas. Subsolador e enxada rotativa eram passados nas camas das fazendas nesta direção pelo menos três vezes por dia. Em cada lote foram coletadas três amostras da superfície da cama para análise de nutrientes e microbiológica: uma próxima ao comedouro, uma próxima ao bebedouro e uma próxima ao meio do lote. As distâncias entre os cochos e os pontos de coleta eram de aproximadamente 1,5 m. A largura dos sistemas, a distância entre cocho de alimentação e cocho de água são de 15 m. Além das análises por lotes, foram realizadas análises por linha, com 4 coletas em cada uma delas: linha do comedouro (LC), linha do bebedouro (LB) e linha do meio

(LM). Na amostragem espacial foram, ainda, coletadas amostras para quantificação bacteriana em três profundidades, de 0-10 cm, 10-20 cm e 20-30 cm, com auxílio de uma escavadeira manual.

As amostras foram coletadas e fixadas imediatamente em paraformaldeído (concentração final de 2%). Posteriormente, foram processadas seguindo protocolo adaptado de Epstein & Rossel (1995). As etapas deste protocolo incluem pesagem (0,5 g), sonicação (3x 60 segundos a 110,7 µm), centrifugação (3x 500 G por 5 minutos) e filtração do sobrenadante em filtro de policarbonato (poro de 0,2 µm).

A técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi utilizada para quantificação de bactérias relacionadas ao ciclo do nitrogênio, segundo o protocolo descrito por Del'Duca *et al*. (2015). Sondas de oligonucleotídeos marcados com fluorocromo Cy3 foram usadas para identificar e quantificar bactérias do filo Nitrospirae, da classe β-proteobacteria, do gênero *Nitrobacter* e da espécie *Pseudomonas fluorescens*. Um marcador controle negativo sem especificidade para nenhum grupo de procariotos também foi utilizado (Tabela 1). Após a hibridização, os filtros foram corados com o fluorocromo DAPI para a quantificação da densidade total de procariotos (bactérias e arqueias). Lâminas com os filtros foram analisadas sob microscópio de epifluorescência Olympus IX-71, equipado com filtros de fluorescência Chroma U-MWU2 e U-MWG2, em dez campos aleatórios no aumento de 1000X. Os dados obtidos foram analisados considerando cada sonda separadamente e, também, o somatório entre a sonda Nit3 e Ntspa712. O somatório considera que a maioria das bactérias do gênero *Nitrobacter* e do filo Nitrospirae, detectadas por estas sondas, são oxidadoras de nitrito (NOB). Neste caso, as análises foram entre bactérias oxidadoras de amônia (AOB) e oxidadoras de nitrito (NOB).

Tabela 1: Sondas específicas utilizadas para análise da composição da comunidade de bactérias do ciclo do nitrogênio espacialmente nas Fazendas 1 e 2 e temporalmente na Fazenda 2.

Marcador	**Especificidade**	**Sequência (5'- 3')**	**Formamida (%)**	**Referência**
Ntspa712	Filo Nitrospira	CGC CTT CGC CAC CGG TGT TCC	50	Daims *et al*., 2001
Nso1225	AOB β-proteobacteria	CGC CAT TGT ATT ACG TGT GA	35	Mobarry *et al*., 1996
Nit3	*Nitrobacter*	CCT GTG CTC CAG GCT CCG	40	Wagner *et al*., 1996
Ps-Ag1	*Pseudomonas fluorescens* Ag1	GAT AAC TCG TCA TCA GCT C	30	Boye, Ahl & Molin, 1995
NON	Controle negativo	TAG TGA CGC CGT CGA	30	Yokokawa & Nagata, 2005

Valores de parâmetros químicos foram determinados de acordo com metodologias específicas de acordo com protocolo descrito por Silva & Queiroz (2006). A matéria seca e cinzas foram analisadas por gravimetria, já a diferença entre elas, resultando na matéria seca, foi utilizado para o cálculo do teor de carbono (58% da matéria orgânica). Já a concentração de cálcio, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, fósforo e zinco foram determinados por espectroscopia de emissão óptica. O teor de nitrogênio, determinado pelo método de Kjeldahl, juntamente com o teor de carbono, foram utilizados para calcular a razão C:N.

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando uma análise de variância de dois fatores (ANOVA Two-Way) para avaliar os efeitos das variáveis experimentais na estrutura das comunidades microbianas e nos nutrientes entre fazendas, lotes, linhas, profundidades e tempo amostral. Os testes foram realizados com o auxílio do software SigmaPlot (versão 12.0), adotando-se um nível de significância de $p < 0,05$. Quando diferenças significativas foram identificadas ($p < 0,05$), o teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado para determinar quais grupos diferiam entre si. Além disso, análises de componentes principais (PCA) foram realizadas para explorar a variação nos dados e identificar padrões subjacentes entre os fatores biológicos e entre os fatores químicos, com o auxílio do software R (versão 4.4.0). Análises de correlação foram conduzidas entre dados químicos e biológicos, utilizando os mesmos softwares e nível de significância mencionado anteriormente. O coeficiente de correlação (r) foi considerado fraco (> 0,3 até 0,5); moderado (> 0,5 até 0,7), forte (> 0,7 até 0,9) e muito forte (> 0,9 até 1).

2.5 RESULTADOS

A densidade das bactérias relacionadas ao ciclo do nitrogênio e suas proporções em relação ao total de procariotos apresentaram uma ampla faixa de variação na sua distribuição. Houve sobreposição dos agrupamentos das fazendas, com os principais componentes explicando quase 70% desta distribuição das variáveis bióticas (Figura 1A). Porém, considerando as densidades e proporções de AOB e NOB (somatório de bactérias detectadas pelas sondas Nit3 e Ntspa712), os componentes principais explicaram mais de 85%, mantendo os padrões de distribuições e sobreposições entre as fazendas (Figura 1B).

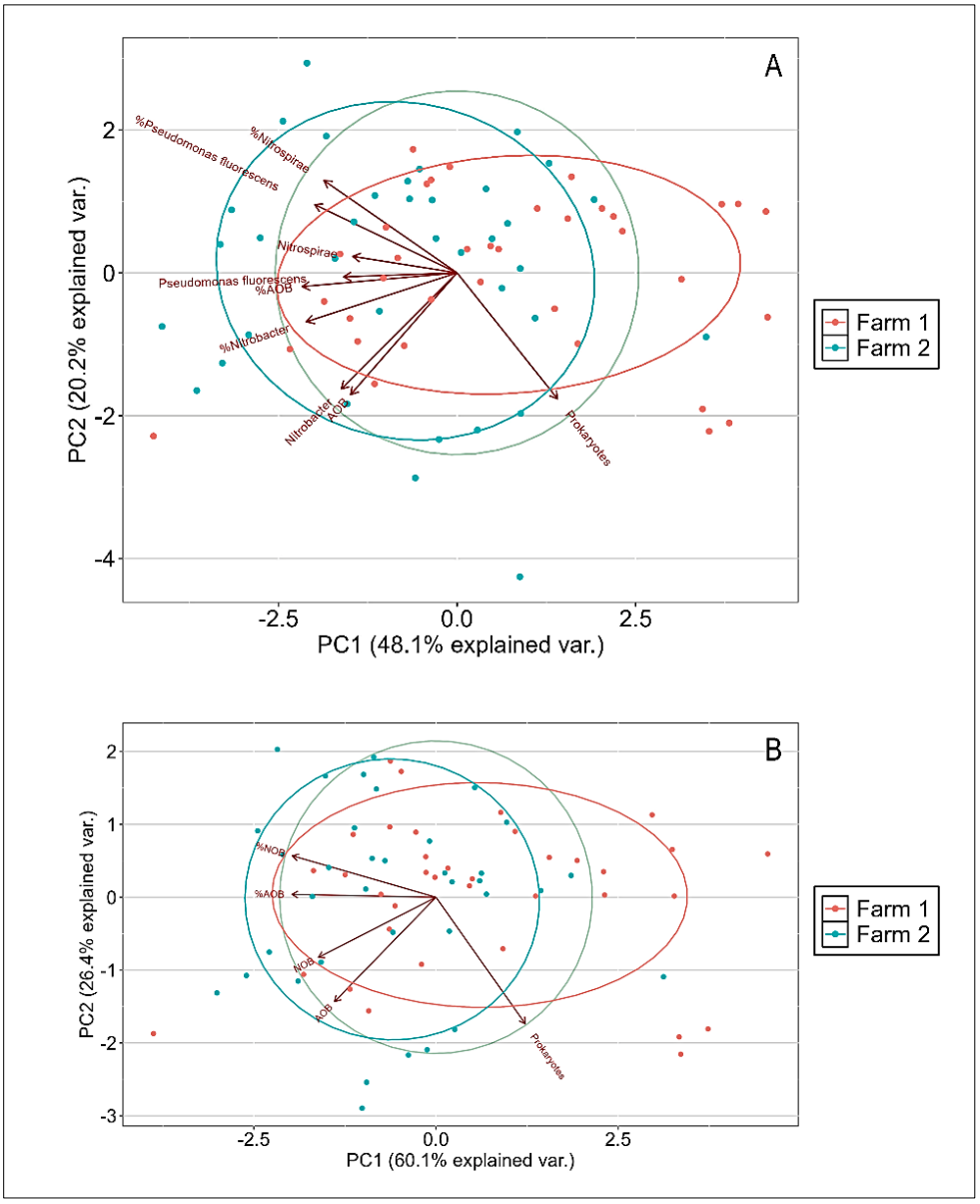


Figura 1: Análise de componentes principais (PCA), de dados logaritmizados, com a distribuição e variação das bactérias separadamente (A) e somente AOB e NOB agrupadas (B) nas Fazendas 1 (pontos vermelhos) e 2 (pontos azuis) coletadas espacialmente em três profundidades.

As densidades de AOB, detectadas pela sonda Nso1225, e as bactérias desnitrificantes, detectadas pela sonda Ps-Ag1 e suas proporções em relação ao total de procariotos foram diferentes comparando o conjunto de amostras (amostras de lotes, linhas e profundidade) entre as fazendas. A diferença na proporção de AOB foi principalmente no fundo, sendo em média 0,07 ± 0,04 % na Fazenda 1 e 0,18 ± 0,10 % na Fazenda 2 (Figura 1A e 1B). As densidades de bactérias detectadas pelas sondas Nit3 e Ntspa712 separadamente, ou agrupadas como NOB, foram semelhantes comparando as duas fazendas. Porém, houve diferença na proporção de NOB entre as fazendas. Essa diferença não se mantém quando analisamos as proporções de *Nitrobacter*

e Nitrospirae separadamente. Não houve diferença nas densidades e proporções de bactérias entre lotes e linhas em nenhuma das fazendas analisadas, quando analisamos as fazendas e todas as sondas separadamente (Figura 2). Entretanto, quando agrupamos as NOB observamos diferença entre lote 3 (0,23 ± 0,14 x 10^{10} cel. g^{-1}) e lote 4 (0,09 ± 0,05 x 10^{10} cel. g^{-1}) na Fazenda 1. Nesta fazenda também foi observada diferença entre a linha do meio (0,21 ± 0,13 x 10^{10} cel. g^{-1}) e linha do comedouro (0,08 ± 0,03 x 10^{10} cel. g^{-1}) na densidade de NOB. Na proporção de NOB, também na Fazenda 1, a linha do meio diferiu das demais linhas.

Não encontramos diferenças significativas nas densidades e nem nas proporções de bactérias quantificadas, comparando as profundidades de cada fazenda separadamente (Figura 2). Também, não encontramos diferença nestas densidades e proporções comparando as linhas e lotes da camada superficial da cama de cada fazenda.

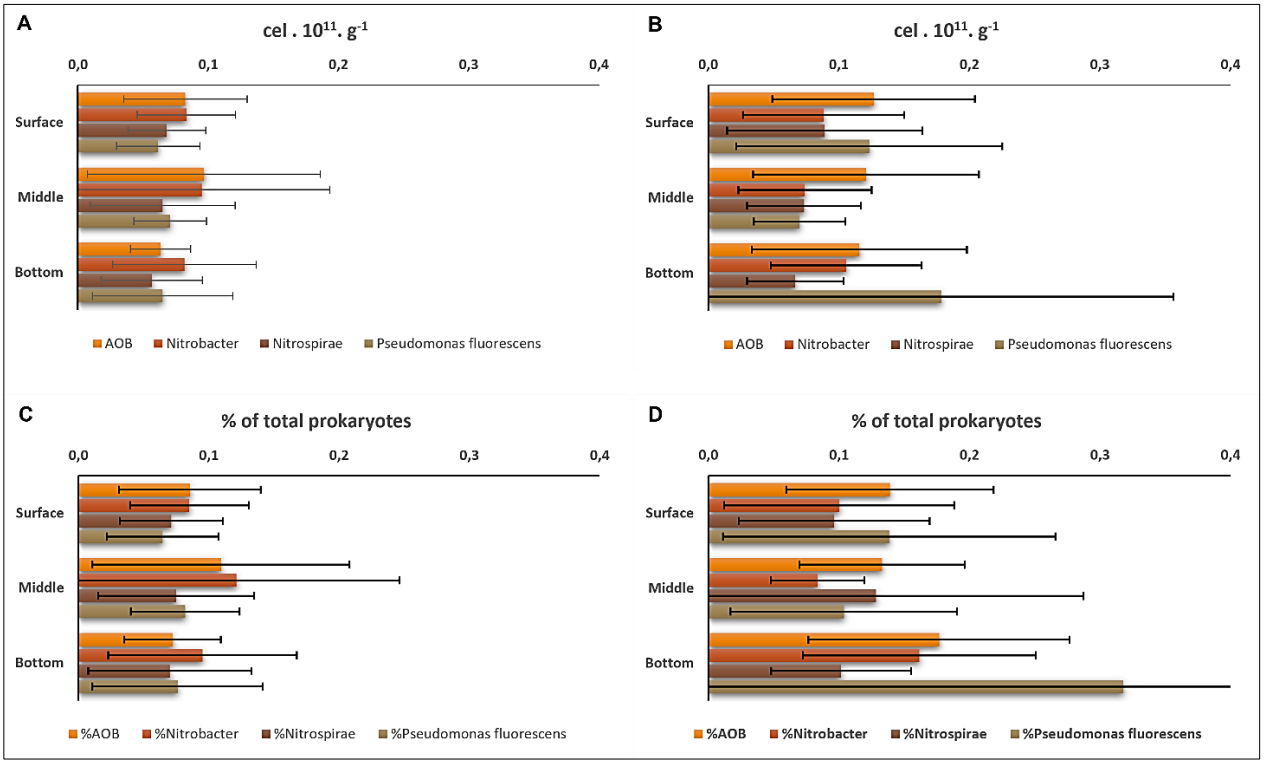


Figura 2: Densidades e proporções de bactérias oxidantes de amônia (AOB), *Nitrobacter*, Nitrospirae e *Pseudomonas fluorescens* nas camadas superficial (0 a 10 cm), intermediária (10 a 20 cm) e inferior (20 a 30 cm) das camas de CB das fazendas 1 (A e C) e 2 (B e D). Os dados são apresentados como médias com barras indicando o desvio padrão.

Na figura 3, podemos observar a separação das duas fazendas de acordo com a análise de distribuição dos nutrientes na superfície da cama destas fazendas. Os principais componentes

químicos explicaram mais de 94% das fazendas. Na Fazenda 1, a explicação é dada principalmente pelo teor de nitrogênio e de carbono inorgânico e, na Fazenda 2, pela concentração de matéria orgânica. Na Fazenda 1, a concentração de N (2,0 ± 0,3%) foi maior quando comparada à Fazenda 2 (0,9 ± 0,1%). Por outro lado, a concentração de C (21 ± 5,7 %) e razão C:N (24 ± 8,6) foram maiores na Fazenda 2. As concentrações dos nutrientes P, Ca, K, Mg, Zn, Cu, Fe e Mn na Fazenda 2 foram abaixo dos níveis de detecção, enquanto os valores obtidos na Fazenda 1 foram, respectivamente, 0,62 ± 0,07%; 1,51 ± 0,21%; 2,63 ± 0,27%; 0,60 ± 0,07%; 162 ± 18,9 ppm; 53,8 ± 5,50 ppm; 3064 ± 728 ppm e 214 ± 102 ppm. Na camada superficial da cama, a linha do meio apresentou os maiores valores de C (25 ± 1,9 %) e de razão C:N (31 ± 5,4%) na Fazenda 2, diferindo das demais linhas. Na Fazenda 1, houve diferença na concentração de C nesta camada entre as linhas do comedouro (9,2 ± 1,5%) e linha do bebedouro (17 ± 2,5%). Correlacionando os dados químicos com os dados biológicos desta camada, encontramos correlação entre o número de procariotos e a razão C:N (moderada e positiva) e o teor de N (forte e negativa) na Fazenda 1. Na Fazenda 2, houve uma correlação moderada entre razão C:N e bactérias do filo Nitrospirae. Não houve nenhuma correlação entre dados biológicos e concentração de N nesta fazenda.

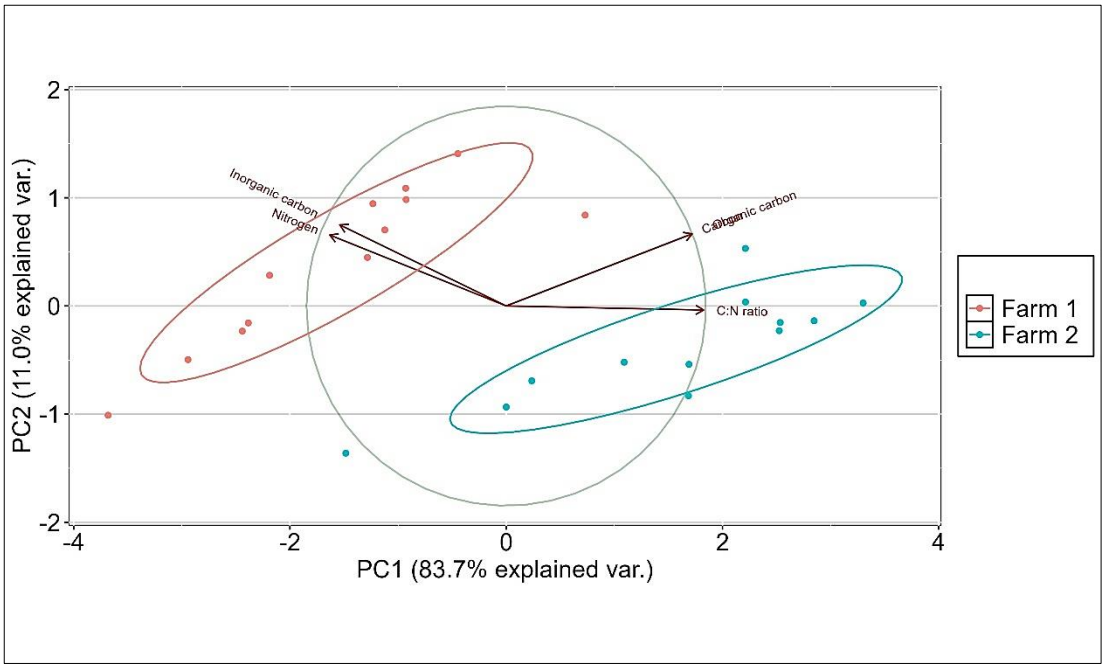


Figura 3: Análise de componentes principais (PCA) de dados logaritmizados destacando a distribuição e separação entre as fazendas 1 (pontos vermelhos) e 2 (pontos azuis), considerando os fatores químicos das amostras coletadas na superfície. Estão sobrepostos carbono orgânico e carbono, no qual carbono orgânico corresponde a matéria seca, o carbono corresponde a matéria orgânica total e o carbono inorgânico corresponde às cinzas.

Na Fazenda 2, que acompanhamos a sucessão ecológica desde sua instalação, encontramos diferenças na concentração de nutrientes analisados ao longo do ano amostrado. A coleta inicial foi agrupada separadamente das coletas realizadas após três meses de compostagem. Nas etapas finais podemos observar uma sobreposição na distribuição dos dados químicos. Os componentes principais explicam > 88% desta distribuição (Figura 4). Embora tenha havido reposição de material da cama nas linhas próximas aos cochos, houve mudança na concentração de nutrientes ao longo do tempo. Maiores valores de razão C:N foi encontrado no primeiro mês de instalação do sistema. Por outro lado, os maiores valores de N foram nos últimos 6 meses. A proporção de P e K foi detectada apenas entre o terceiro e sexto mês de funcionamento do sistema. Nenhum dos fatores químicos e nem biológicos, quanto as sondas analisadas separadamente, apresentaram diferença significativa entre os lotes e linhas desta fazenda ao longo dos meses de acompanhamento da compostagem desta cama (Figura 4).

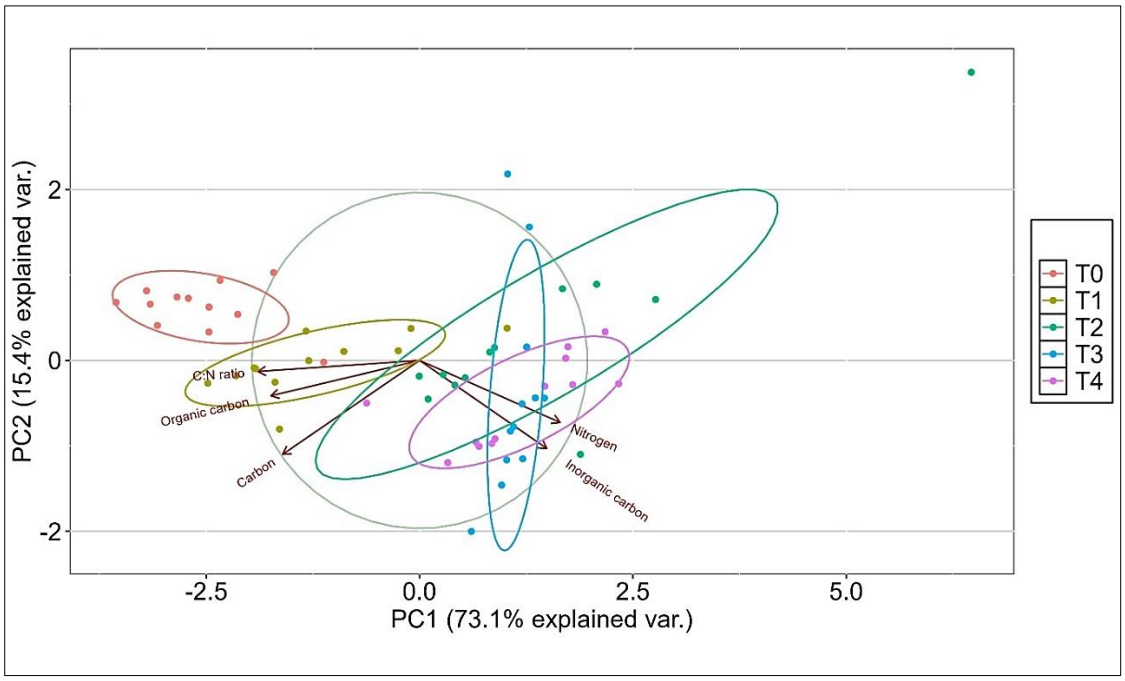


Figura 4: Análise de componentes principais (PCA) de dados químicos logaritmizados destacando a distribuição e variabilidade das amostras coletadas temporalmente na superfície da Fazenda 2. Os tempos T0 a T4 correspondem, respectivamente, à implementação do sistema e ao primeiro, terceiro, sexto e décimo segundo mês após.

A razão C:N apresentou uma correlação fraca e negativa com a densidade e proporção de *Nitrobacter* spp. e, também, com as proporções de *P. fluorescens*. Todas as proporções destas bactérias também correlacionam positivamente com o teor de N, seja uma correlação fraca

(proporção de AOB e de bactérias do filo Nitrospirae) ou moderada (proporção de *Nitrobacter* spp. e *P. fluorescens*). Já as densidades de AOB e de bactérias Nitrospirae não apresentaram correlação com o teor de N ao longo do tempo. As demais densidades apresentaram correlação positiva fraca (procariotos e *P. fluorescens*) e moderada (*Nitrobacter* spp.) (Figura 5).

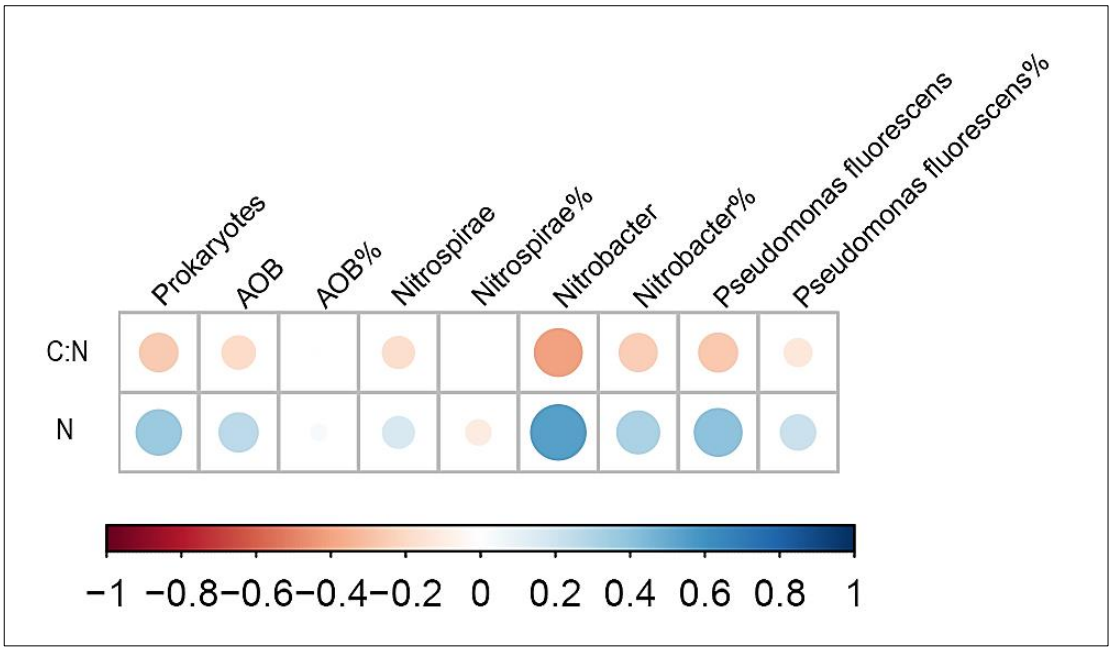


Figura 5: Correlação de Pearson entre densidade e proporção dos grupos bacterianos com a razão C:N e Nitrogênio total para todas as amostras coletadas na Fazenda 2 temporalmente. O coeficiente de correlação (*r*) foi considerado fraco (>0,3 até 0,5); moderado (>0,5 até 0,7), forte (>0,7 até 0,9) e muito forte (>0,9 até 1).

Menores densidades de *Nitrobacter* spp. e *P. fluorescens* foram encontradas nos primeiros seis meses de instalação do sistema nesta fazenda. A densidade de bactérias do filo Nitrospirae foi menor (0,5 ± 0,4 cel 10^{11} g^{-1}) no terceiro mês de amostragem e maior (1,3 ± 0,6 cel 10^{11} g^{-1}) ao final de um ano. Menores valores de densidade de AOB e de NOB foram encontrados no início (T0) e, também, no terceiro mês (T2) de compostagem, enquanto os maiores foram na metade do processo (T3). Apenas a proporção de *Nitrobacter* spp. em relação ao total de procariotos foi diferente entre o início e o final das coletas (Figura 6).

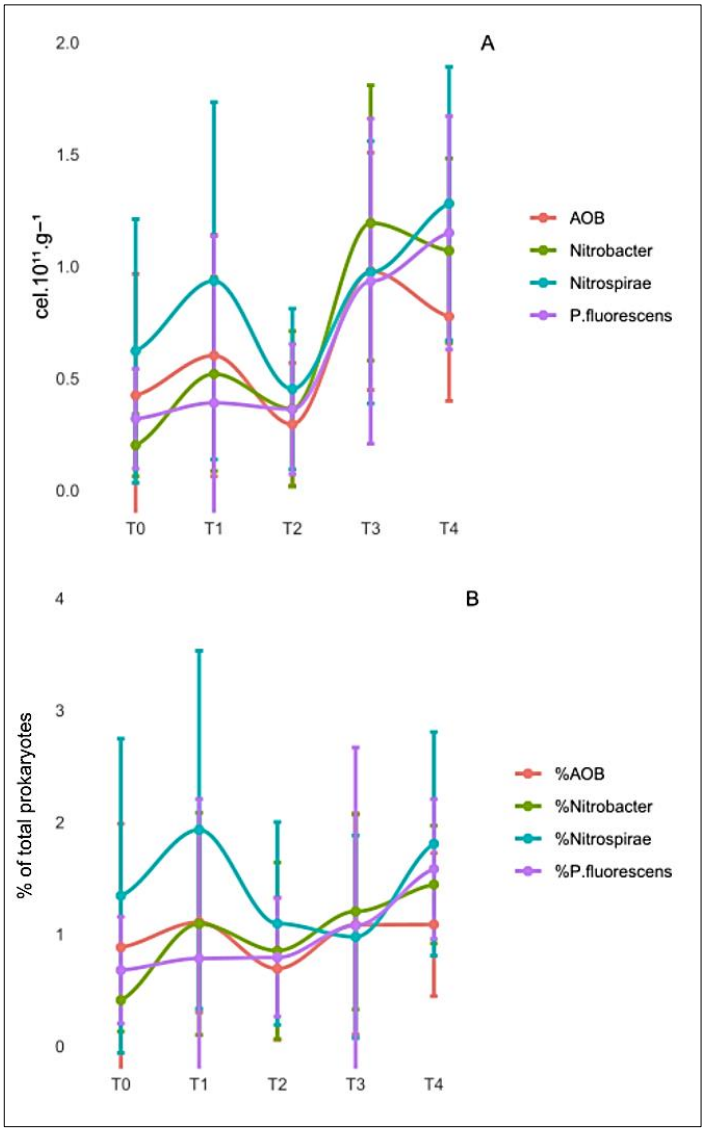


Figura 6: Densidade (A) e proporção (B) (média ± desvio padrão) de bactérias ligadas ao ciclo do nitrogênio coletadas temporalmente (T0 = instalação do sistema; T1, T2, T3 e T4 = um mês, três meses, seis meses e doze meses, respectivamente, após a instalação do sistema).

2.6 DISCUSSÃO

As fazendas apresentaram atributos ambientais e estrutura de comunidade bacteriana distintas de acordo com a etapa da compostagem da cama. A menor variação foi do componente químico, que explicam melhor a diferença entre as camas de um composto jovem e de outro maduro. A heterogeneidade das amostras nas camas dos sistemas foi constatada pela variabilidade da comunidade microbiana entre as fazendas e dentro de cada fazenda. Vários fatores podem influenciar a heterogeneidade das amostras microbianas na cama do sistema de compostagem, incluindo localização, temperatura e tipo de resíduo a ser compostado (Robles *et al.*, 2020). Eckelkamp e colaboradores (2016), concluíram que a temperatura interna do composto

aumenta com a temperatura máxima do celeiro. A variabilidade espacial dos atributos da cama em celeiros de compostagem também ocorre em sistemas climatizados (Oliveira *et al*., 2021; Andrade *et al*., 2022). Os sistemas CB de ambas as fazendas são abertos e com ventilação. As fazendas se encontram a menos de 100 km de distância uma da outra, portanto, possuem as mesmas características climáticas (tropical de altitude) e variação de temperatura atmosféricas (temperatura média mínima de 9 ºC e máxima de 26 ºC). O tempo de ventiladores acionados variou durante a época do ano. Embora os dados não mostrem, no verão, os ventiladores foram ligados mais vezes e por mais tempo.

Serragem é o material de cama mais comum e com características valiosas para utilização em camas compostagem (Ofner-Schröck *et al*., 2015; Llonch *et al*., 2021; Silva *et al*., 2022). Estes autores destacam que a disponibilidade local e custo é variável e que fontes alternativas têm sido apresentadas. O papel do material de cama está diretamente relacionado com a otimização das condições de compostagem e melhoria da degradação da matéria orgânica (Duan *et al*., 2021). Ambas as fazendas utilizavam maravalha na constituição da cama, mas não dos mesmos fornecedores e nem da mesma origem de biomassa vegetal. Mesmo na fazenda que acompanhamos a compostagem da cama por um ano (Fazenda 2), o fornecedor e a origem do material também não foram os mesmos. Resultados positivos da maravalha em camas de CB têm sido relatados, destacando suas propriedades como isolantes e absorventes (Lendelová *et al*., 2016). Há relação entre os materiais de cama e a composição bacteriana, com diferenças nas comunidades bacterianas entre os diferentes tipos de cama (Li *et al*., 2020; Freu *et al*., 2023). Varma e colaboradores (2018) descobriram que a estrutura da comunidade bacteriana variou com os materiais de compostagem, com predominância de Bacilos, γ, β-proteobactérias e actinobactérias. Alguns materiais usados para cama podem possuir substâncias inibidoras de crescimento de microrganismos tornando a compostagem mais lenta. Enquanto isso, outros materiais podem acelerar o processo com partículas com maior razão superfície:volume. Assim, o tamanho da partícula pode influenciar na velocidade de colonização por microrganismos e, consequentemente, na velocidade de compostagem.

A composição microbiana da cama em sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn* é influenciada também por práticas de manejo (Neher *et al*., 2022). Parâmetros físicos e químicos como temperatura, pH, umidade, aeração, disponibilidade de metabólitos influenciaram a variação das populações microbianas durante a compostagem (Coelho *et al*., 2013; Bhatia *et al*., 2013; Favero *et al*., 2015; Huhe *et al*., 2017; Guesine *et al*., 2023). Esses estudos ressaltam coletivamente a importância de compreender e gerenciar através de práticas de manejo a variação bacteriana em sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn*. A

cama de sistema de compostagem, que visa proporcionar conforto às vacas leiteiras, requer manejo eficiente e ambiente microclimático adequado (Pilatti *et al*., 2019). Observações prévias mostraram maior umidade nas linhas próximas aos cochos, levando à hipótese de que haveria diferença nos dados químicos e biológicos entre as linhas. Como as vacas não saem dos sistemas para alimentar, acreditamos que esta maior umidade seja devido ao comportamento eliminativo das vacas durante a alimentação. Embora não tenha sido mensurado o teor de umidade, os responsáveis pelas fazendas decidiram pela reposição de parte da cama nas linhas próximas aos cochos em alguns momentos da compostagem. Mesmo com essa reposição, nossa hipótese foi aceita para dados químicos, havendo diferença no teor de carbono e, consequentemente, razão C:N entre a linha do meio, visualmente mais seca que as demais linhas na camada superficial da fazenda em processo inicial de compostagem (Fazenda 2). O mesmo não aconteceu na Fazenda 1, onde a concentração de carbono na linha do comedouro é menor que a linha do bebedouro. Os maiores valores de carbono e razão C:N encontrados na linha do meio na Fazenda 2 podem ser explicados pela menor umidade e, consequentemente, maior temperatura encontrada nesta linha. Não houve diferença nas densidades ou proporções de bactérias ligadas ao ciclo de nitrogênio nesta fazenda. Entretanto, houve correlação entre a densidade de bactérias do filo Nitrospirae e a razão C:N. Procariotos produzem calor ao degradar carbono e maiores temperaturas determinam maior eficiência na compostagem e quantidade de bactérias benéficas (Guesine *et al*., 2023).

O filo Nitrospirae (Oren & Garrity, 2021) inclui as classes Nitrospiria, Thermodesulfovibrionia e uma variedade de bactérias ambientais não classificadas. No entanto, a hipótese foi rejeitada comparando as bactérias separadamente entre linhas e lotes na superfície da cama de ambas as fazendas. Apenas quando foi somado o número de NOB encontramos diferença entre linha do meio e linha do comedouro na Fazenda 1. Na linha do meio, a proporção de NOB também foi diferente da linha do bebedouro. O filo Nitrospirae inclui vários outros gêneros que não oxidam nitrito e ainda não estão classificados. Além disso, algumas espécies do gênero *Nitrospira* podem participar de todas as etapas da nitrificação, ou seja, oxidação de amônia e de nitrito, como mencionado anteriormente. A degradação da matéria orgânica e as comunidades bacterianas associadas à fase termofílica da compostagem foi comparada usando dois tipos diferentes de digestores anaeróbios, um proveniente de um digestor de lodo de esgoto e outro de um digestor agrícola (Ince *et al*., 2020). Estes autores encontraram que o processo de compostagem exibiu variações semelhantes de perfis bacterianos, apesar das diferenças inerentes na matéria-prima, juntamente com a composição bacteriana inicial distinta. De acordo com os dados obtidos por eles através do sequenciamento do *amplicon* do gene 16S rRNA, o digestor de lodo de esgoto foi constituído por mais de 20 filos bacterianos com Proteobacteria (21%) e

Chloroflexi (21%) sendo predominantes, enquanto digestor agrícola foi representada por apenas sete filos nos quais Firmicutes foi o filo mais abundante (73%). No entanto, os perfis das comunidades bacterianas dos dois sistemas de compostagem tornaram-se representados de forma mais semelhante a nível do filo. Diferenças nos níveis taxonômicos das sondas utilizadas também podem explicar a variação nos dados biológicos, já que foram utilizadas sondas espécie-específicas para *Pseudomonas fluorescens* até ao nível taxonômico de filo (Nitrospirae). Na análise temporal na fazenda 2, nenhuma diferença foi encontrada entre lotes e linhas analisando separadamente, ou não, as densidades e proporções de bactérias. Na diferença entre as proporções, a variação no número total de procariotos deve ser levada em consideração. Houve correlação entre total de procariotos (bactérias e arqueias) e teor de nitrogênio na análise espacial na Fazenda 1 e na análise temporal na Fazenda 2.

A frequência de aeração é uma importante prática de manejo, porque influencia o consumo de oxigênio, as atividades enzimáticas e a sucessão da comunidade bacteriana na compostagem (Zhang *et al*., 2019). Em ambas as fazendas, tratores revolvendo e consequentemente aerando a cama passavam por toda extensão dos celeiros. A aeração na cama do CB também desempenha um papel crucial no processo de desnitrificação. Maeda e colaboradores (2018) descobriram que a adição de composto maduro ao composto de esterco leiteiro em reator de compostagem com aeração forçada levou a múltiplos picos de emissão de óxido nitroso, indicando o envolvimento de desnitrificadores no processo. Houve diferenças na densidade e proporção de bactérias potencialmente desnitrificantes de *P. fluorescens* entre as fazendas com diferentes estágios de sucessão ecológica. As menores densidades médias dessas bactérias foram encontradas na fazenda com composto maduro e a maior concentração de nitrogênio (Fazenda 1). A presença de micróbios essenciais e a sua função na transformação do nitrogênio durante a compostagem inclui também a nitrificação e desnitrificação (Chen *et al*., 2020).

A adição de elementos específicos pode alterar morfologicamente o composto e reduzir os níveis de nitrogênio e fósforo (Kim *et al*., 2021). Além disso, a compostagem de resíduos agrícolas melhora o teor de matéria orgânica do solo e os níveis de nutrientes, com variações nas concentrações de nitrogênio e fósforo dependendo das combinações de pilhas de composto (Hashim *et al*., 2022). Uma série de estudos exploraram o conteúdo de nutrientes das camas de compostagem. As camas de compostagem muitas vezes carecem dos níveis recomendados de macro e micronutrientes, potencialmente devido ao substrato desequilibrado durante a preparação (Mengistu *et al*., 2023). A compostagem de diferentes tipos de palha com a adição de microrganismos contribuiu para a intensidade de sua mineralização, aumentando a concentração

de determinados microelementos no composto (Mitiohlo *et al*., 2023). Os processos de compostagem podem impactar significativamente os parâmetros químicos do composto, incluindo as concentrações de cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco, manganês e potássio (Silva *et al*., 2020). Comparando as duas fazendas, observamos que os micronutrientes estavam em concentrações muito baixas, menor que o limite de detecção na Fazenda 2. Apenas P e K foram detectados no meio do processo de compostagem acompanhado por um ano nessa fazenda.

A aeração da cama de compostagem melhora a evaporação da água, o que também pode impactar o processo de nitrificação, que é essencial para a decomposição da matéria orgânica e a liberação de nutrientes (Xiong *et al*., 2017). Uma correlação entre nitrificação e emissão de óxido nitroso na compostagem aerada forçada também foi encontrada por Tsutsui *et al*. (2013). O sistema também pode ajudar a reduzir a lixiviação de nitrogênio, embora sejam necessárias mais pesquisas para compreender plenamente o seu impacto ambiental. Menor densidade e proporção de bactérias AOB foram encontradas na fazenda 1, que possui composto maduro há mais de um ano. Rápidas mudanças nas propriedades do composto e na diversidade da comunidade microbiana foram relatadas durante a compostagem da cama com resíduos frescos de cavalos, com uma alta diversidade de espécies capazes de amonificação e desnitrificação (Grenier *et al*., 2023). A natureza complexa e dinâmica das comunidades microbianas na cama do sistema de compostagem deve ser considerada. A diferença entre as fazendas na densidade e proporção de AOB foi principalmente no fundo. Pesquisas em laticínios com cama de compostagem mostraram que as concentrações bacterianas na cama variam com a profundidade, com concentrações mais altas na superfície em comparação com a camada profunda (Favero *et al*., 2015). Guo e colaboradores, (2012) descobriram que diferentes locais dentro de uma pilha de compostagem continham comunidades microbianas distintas, com a amostra do estrato superior apresentando a maior diversidade.

O uso de galpões com cama de compostagem em sistemas de criação de vacas leiteiras demonstrou trazer vários benefícios. Estas incluem a melhoria da saúde e do bem-estar das vacas, bem como uma maior qualidade do leite e dos produtos lácteos (Biasato *et al*., 2019). O sistema também permite um comportamento animal mais natural e maior conforto durante o descanso. No entanto, o manejo adequado é crucial para manter a limpeza das vacas e reduzir o risco de mastite, particularmente devido às altas concentrações bacterianas na cama (Leso *et al*., 2020; Patel *et al*., 2019). Em condições quentes e úmidas, as vacas multíparas deste sistema apresentam comportamentos agonísticos mais frequentes, enquanto as vacas primíparas são mais limpas (Pilatti *et al*., 2019). A microbiota dos sistemas de cama compostada pode interagir com a glândula mamária da vaca, impactando potencialmente a saúde do úbere (Ray *et al*., 2022;

Porcellato *et al*., 2020). A resistência aos antibióticos e a expressão gênica estão ligadas às condições ambientais e ao número de microrganismos. Apenas na Fazenda 1 foi encontrada diferença na densidade de NOB entre lote com vacas no final de lactação e lote com novilhas.

No início do processo de compostagem os microrganismos que entraram junto com a serragem eram os principais componentes microbianos destes sistemas. Com o passar do tempo há um aumento da contribuição de microrganismos entrando via excretas das vacas. Uma pesquisa em nível nacional foi realizada na China para adquirir consensos sobre as propriedades biofisioquímicas de compostos. Um total de 116 amostras de composto coletadas de 16 províncias da China foram analisadas por sequenciamento de alto rendimento de *amplicons* do gene 16S rRNA bacteriano (Wang *et al*., 2020). Eles identificaram comunidades bacterianas distintas em diferentes compostos, com um microbioma central de 26 OTUs e a presença de potenciais patógenos. Estas OTUs afiliadas a Firmicutes e Actinobacteria estavam presentes na maioria (> 90%) dos compostos e a maioria destas espécies bacterianas estavam possivelmente associadas à biodegradação de materiais orgânicos. Ainda foram detectados 629 potenciais patógenos bacterianos humanos ou animais, representando uma média de 1,21% do total do gene 16S rRNA. Especificamente, em sistema de criação de vacas leiteiras do tipo CB, a análise bibliométrica realizada por Silva *et al*. (2022) mostra um número crescente de publicações científicas. Dentre as 20 publicações mais relevantes destacadas por eles, os trabalhos que avaliam a comunidade microbiana estão ligados principalmente às bactérias causadoras de mastite, identificadas pela técnica de isolamento e cultivo. Ainda existem limitações na prática rotineira de isolamento e cultivo de bactérias ligadas ao ciclo do nitrogênio. A técnica de FISH que utilizamos para a quantificação de microrganismos é independente de cultivo e de amplificação de ácidos nucleicos. A expressão de determinados genes é dependente da densidade da espécie de microrganismos, e não foi possível avaliar sua atividade com o tipo de FISH utilizada. A variação no número de bactérias foi acompanhada por um ano na Fazenda 2. Além das entradas de microrganismos nos sistemas, temos também o crescimento e estabelecimento dos microrganismos ao longo do tempo, com sucessão entre espécies com diferentes taxas de crescimento. O número de indivíduos de cada espécies presentes podem modificar de acordo com estratégias de crescimento. Bactérias mais especialistas, com crescimento mais lento, tendem apresentar maior densidade em períodos mais tardios da compostagem (Nemet *et al*., 2021).

O número de procariotos diminui com a predação (*top down control*) ou limitação de nutrientes (*bottom up control*). Nos sistemas de criação de vacas do tipo CB, a saída de microrganismos se dá principalmente pela retirada ou troca da cama. O potencial de um sistema de compostagem de camas para contribuir para a economia circular, através da reciclagem e

reutilização de materiais, é destacado por Kuipers *et al*. (2022). Além disso, a escolha de materiais para a cama, como biomassa florestal e serragem, ricos em matéria orgânica, contribui para a qualidade do composto produzido (Llonch *et al*., 2021; Meng *et al*., 2021). Friis Pedersen & Ebbesvik (2020) introduziram uma abordagem inovadora para o cultivo em estufas utilizando celeiros de compostagem, que podem potencialmente contribuir para práticas agrícolas sustentáveis. A segurança da compostagem de esterco leiteiro para reutilização como cama é uma preocupação, com bactérias potencialmente patogênicas presentes na cama composta por esterco sólido reciclado (Wu *et al*., 2020). Além disso, descobriu-se que a atividade e a comunidade de NOB são mais responsivas do que a sua abundância aos fertilizantes à base de amônio no solo agrícola, sugerindo um papel potencial para estas bactérias na transformação do nitrogênio (Ouyang & Norton, 2020). Descobriu-se que a adição de composto aumenta a abundância de bactérias oxidantes de amônia (AOB) e desnitrificantes, moldando suas composições comunitárias e redes de coocorrência em solo negro (Yang *et al*., 2020). As NOB analisadas separadamente e *P. fluorescens* apresentaram maior densidade após um ano de compostagem na Fazenda 2, enquanto as densidades de AOB foram maiores na metade desse tempo (6 meses). As concentrações de nutrientes ao final, assim como encontrado na Fazenda 1, foram características de um composto maduro, ou seja, alta concentração de nitrogênio e baixa relação C:N. O processo de nitrificação em celeiros de compostagem é complexo e multifacetado, influenciado por vários fatores. Há necessidade de uma abordagem holística para gerir o processo de nitrificação em celeiros de compostagem, considerando fatores como a razão C:N, comunidades microbianas e condições ambientais. A razão C:N inicial é um parâmetro crítico que afeta diretamente a estabilidade e a maturidade do composto. Além disso, uma razão C:N bem equilibrada leva a uma compostagem mais eficiente, reduzindo custos e aumentando a capacidade de produção. Cáceres e colaboradores (2018) destacaram a importância da nitrificação na conservação do nitrogênio no composto e o papel das bactérias oxidadoras de amônia e arqueias nesse processo. A compostagem termofílica em camas de celeiros de compostagem demonstrou ser uma estratégia eficaz para reduzir a perda de nitrogênio, com a razão C:N desempenhando um papel chave na redução das emissões de odores e na melhoria da qualidade do composto (De Boer & Wiersma, 2021). Semelhante aos nossos resultados, uma investigação sobre camas de compostagem mostrou que a abundância e diversidade de bactérias nitrificantes, AOB e NOB podem variar com o tempo de compostagem (Wiraswati *et al*., 2023). Eles encontraram maior diversidade de bactérias nitrificantes na cama de compostagem em amostras mais jovens. Descobriu-se que AOB desempenham um papel significativo na redução das emissões de odores e na promoção do processo de humificação no composto de esterco bovino (Xu *et al*., 2022). Além disso, foi

demonstrado que o uso de composto de esterco bovino aumenta a expressão de genes oxidantes de amônia e a atividade de AOB e arqueias oxidantes de amônia (AOA) em meios de biofiltração para desodorização de amônia (Kitamura *et al*., 2021). A influência de diferentes técnicas de compostagem nas estruturas de comunidade de AOB e desnitrificantes do tipo *nirK* tem sido explorada, com particular ênfase na sua correlação com as emissões de óxido nitroso (Jiang *et al*., 2020). Por outro lado, o processo de compostagem pode levar ao aumento da emissão de amônia, uma preocupação que precisa ser abordada (Fillingham *et al*., 2017).

2.7 CONCLUSÃO

Em nosso trabalho, menores densidades de AOB e *P. fluorescens* foram encontradas na fazenda com o composto maduro, isto é, com maior teor de N e menor de C e razão C:N. Entretanto, a correlação entre razão C:N e N foi apenas com o total de procariotos nesta fazenda. Isto sugere que outras bactérias e arqueias participam da ciclagem do nitrogênio. Ainda nesta fazenda, na linha com menor concentração de C encontramos, também, menor densidade e proporção de NOB. Comparando as fazendas, observamos que no primeiro mês de compostagem a Fazenda 2 já tinha mais bactérias AOB e *P. fluorescens* do que a Fazenda 1. Esta quantidade aumentou ainda mais depois de seis meses de compostagem. Embora não tenha havido diferença entre as densidades de NOB entre as fazendas, as suas densidades foram maiores, também, após seis meses na Fazenda 2. As NOB do filo Nitrospirae apresentaram correlação com N e C:N nesta fazenda. Concluímos que há uma maior variabilidade de bactérias nitrificantes e desnitrificantes do que o produto de suas atividades na ciclagem de nitrogênio.

2.8 AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos proprietários das fazendas, suas famílias e funcionários que nos receberam de forma atenciosa e prestativa. Agradecemos também a todos os alunos e técnicos de nossas Instituições pelo auxílio em quaisquer etapas de desenvolvimento deste trabalho.

2.9 FINANCIAMENTO

Este trabalho contou com o apoio da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, Projeto SEG 03.13.05.010.00.000), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

2.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade, R.R., Tinôco, I.D.F.F., Damasceno, F.A., Ferraz, G.A.S., Freitas, L.C.S.R., Ferreira, C.D.F.S., Barbari, M., Teles Junior, C.G.S., 2022. Spatial analysis of microclimatic variables in compost-bedded pack barn with evaporative tunnel cooling. An. Acad. Bras. Ciênc. 94, e20210226. https://doi.org/10.1590/0001-3765202220210226

Barberg, A.E., Endres, M.I., Janni, K.A., 2007. Compost Dairy Barns in Minnesota: A Descriptive Study. Applied Engineering in Agriculture 23, 231–238. https://doi.org/10.13031/2013.22606

Bhatia, A., Madan, S., Sahoo, J., Ali, M., Pathania, R., Kazmi, A.A., 2013. Diversity of bacterial isolates during full scale rotary drum composting. Waste Management 33, 1595–1601. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2013.03.019

Biasato, I., D'Angelo, A., Bertone, I., Odore, R., Bellino, C., 2019. Compost bedded-pack barn as an alternative housing system for dairy cattle in Italy: effects on animal health and welfare and milk and milk product quality. Italian Journal of Animal Science 18, 1142–1153. https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1623095

Black, R.A., Taraba, J.L., Day, G.B., Damasceno, F.A., Bewley, J.M., 2013. Compost bedded pack dairy barn management, performance, and producer satisfaction. Journal of Dairy Science 96, 8060–8074. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6778

Boye, M., Ahl, T., Molin, S., 1995. Application of a strain-specific rRNA oligonucleotide probe targeting *Pseudomonas fluorescens* Ag1 in a mesocosm study of bacterial release into the environment. Appl Environ Microbiol 61, 1384–1390. https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1384-1390.1995

Cáceres, R., Malińska, K., Marfà, O., 2018. Nitrification within composting: A review. Waste Management 72, 119–137. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.10.049

Chen, H., Awasthi, S.K., Liu, T., Duan, Y., Ren, X., Zhang, Z., Pandey, A., & Awasthi, M. K., 2020. Effects of microbial culture and chicken manure biochar on compost maturity and greenhouse gas emissions during chicken manure composting. Journal of hazardous materials, 389, 121908. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121908

Coelho, L., Reis, M., Dionísio, L., 2013. Variation in microbial population during composting of agro-industrial waste. Appl Microbiol Biotechnol 97, 4179–4186. https://doi.org/10.1007/s00253-012-4202-1

Daims, H., Lebedeva, E.V., Pjevac, P., Han, P., Herbold, C., Albertsen, M., Jehmlich, N., Palatinszky, M., Vierheilig, J., Bulaev, A., Kirkegaard, R.H., Von Bergen, M., Rattei, T., Bendinger, B., Nielsen, P.H., Wagner, M., 2015. Complete nitrification by Nitrospira bacteria. Nature 528, 504–509. https://doi.org/10.1038/nature16461

Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H., Wagner, M., 2001. In Situ Characterization of Nitrospira -Like Nitrite-Oxidizing Bacteria Active in Wastewater Treatment Plants. Appl Environ Microbiol 67, 5273–5284. https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5273-5284.2001

De Boer, H.C., Wiersma, M., 2021. Thermophilic composting of the pack can reduce nitrogen loss from compost-bedded dairy barns. Biosystems Engineering 210, 20–32. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2021.07.015

Del'Duca, A., Cesar, D.E., Abreu, P.C., 2015. Bacterial community of pond's water, sediment and in the guts of tilapia (Oreochromis niloticus) juveniles characterized by fluorescent in situ hybridization technique. Aquac Res 46, 707–715. https://doi.org/10.1111/are.12218

Del'Duca, A., Cesar, D.E., Freato, T.A., Azevedo, R.D.S., Rodrigues, E.M., Abreu, P.C., 2019. Variability of the nitrifying bacteria in the biofilm and water column of a recirculating aquaculture system for tilapia (Oreochromis niloticus) production. Aquac Res 50, 2537–2544. https://doi.org/10.1111/are.14211

Duan, H., Ji, M., Chen, A., Xie, S., Sun, J., Shi, J., Li, X., Zhang, B., 2021. Assessing the Performance and the Microbial Dynamics of Co-composting System Using Recycled Cow Manure and Bedding Material Waste https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-234233/v1

Eckelkamp, E.A., Taraba, J.L., Akers, K.A., Harmon, R.J., Bewley, J.M., 2016. Understanding compost bedded pack barns: Interactions among environmental factors, bedding characteristics, and udder health. Livestock Science 190, 35–42. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.05.017

Epstein, S., Rossel, J., 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. Mar. Ecol. Prog. Ser. 117, 289–298. https://doi.org/10.3354/meps117289

Favero, S., Portilho, F.V.R., Oliveira, A.C.R., Langoni, H., Pantoja, J.C.F., 2015. Longitudinal Trends and Associations between Compost Bedding Characteristics and Bedding Bacterial Concentrations. JAS 7, p58. https://doi.org/10.5539/jas.v7n10p58

Fillingham, M.A., VanderZaag, A.C., Burtt, S., Baldé, H., Ngwabie, N. M., Smith, W., Hakami, A., Wagner-Riddle, C., Bittman, S., & MacDonald, D., 2017. Greenhouse gas and ammonia emissions from production of compost bedding on a dairy farm. Waste management, 70, 45–52. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.09.013

Freu, G., Garcia, B.L.N., Tomazi, T., Di Leo, G.S., Gheller, L.S., Bronzo, V., Moroni, P., Dos Santos, M.V., 2023. Association between Mastitis Occurrence in Dairy Cows and Bedding Characteristics of Compost-Bedded Pack Barns. Pathogens 12, 583. https://doi.org/10.3390/pathogens12040583

Friis Pedersen, S., Ebbesvik, M., 2020. Innovative greenhouse cultivation in compost barn. Acta Hortic. 1123–1128. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1296.142

Grenier, V., Gonzalez, E., Brereton, N.J., Pitre, F.E., 2023. Dynamics of bacterial and archaeal communities during horse bedding and green waste composting. PeerJ 11, e15239. https://doi.org/10.7717/peerj.15239

Guesine, G.D., Silveira, R.M.F., Silva, I.J.O.D., 2023. Physical and environmental characteristics of the compost barn system and its effects on the physical integrity, reproduction and milk production of dairy cattle: a scoping review. JABB 11, 1–6. https://doi.org/10.31893/jabb.23010

Guo, Y., Zhang, J., Deng, C., Zhu, N., 2012. Spatial Heterogeneity of Bacteria: Evidence from Hot Composts by Culture-independent Analysis. Asian Australas. J. Anim. Sci 25, 1045–1054. https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11341

Hashim, S., Waqas, M., Rudra, R.P., Akhtar Khan, A., Mirani, A.A., Sultan, T., Ehsan, F., Abid, M., Saifullah, M., 2022. On-Farm Composting of Agricultural Waste Materials for Sustainable Agriculture in Pakistan. Scientifica 2022, 1–12. https://doi.org/10.1155/2022/5831832

Huhe, Jiang, C., Wu, Y., Cheng, Y., 2017. Bacterial and fungal communities and contribution of physicochemical factors during cattle farm waste composting. MicrobiologyOpen 6, e00518. https://doi.org/10.1002/mbo3.518

Ince, O., Ozbayram, E.G., Akyol, Ç., Erdem, E.I., Gunel, G., Ince, B., 2020. Bacterial Succession in the Thermophilic Phase of Composting of Anaerobic Digestates. Waste Biomass Valor 11, 841–849. https://doi.org/10.1007/s12649-018-0531-3

Janni, K.A., Endres, M.I., Reneau, J.K., Schoper, W.W., 2007. Compost Dairy Barn: Layout and Management Recommendations. Applied Engineering in Agriculture 23, 97–102

Jiang, T., Chang, J., Yang, J., Yang, F., Ma, X., Yi, Z., Tang, Q., Li, G., 2020. Variations of community structures of ammonia oxidizing and denitrifying bacteria correlated with N 2 O emissions among different composting techniques. J of Chemical Tech & Biotech 95, 394–401. https://doi.org/10.1002/jctb.5958

Kim, D., Hwang, S.-J., Kim, Y., Jeong, C.H., Ryoo, K.S., 2021. Study on the Morphological Change and Reduction of Nitrogen and Phosphorous in Litter and Compost of Cowshed. Asian J. Chem. 33, 2826–2830. https://doi.org/10.14233/ajchem.2021.23453

Kitamura, R., Kozaki, T., Ishii, K., Iigo, M., Kurokura, T., Yamane, K., Maeda, I., Iwabuchi, K., Saito, T., 2021. Utilizing Cattle Manure Compost Increases Ammonia Monooxygenase A Gene Expression and Ammonia-oxidizing Activity of Both Bacteria and Archaea in Biofiltration Media for Ammonia Deodorization. Microb. Environ. 36, n/a. https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20148

Kuipers, A., Galama, P., Leso, L., Bruegemann, K., Klopčič, M., 2022. A Composting Bedding System for Animals as a Contribution to the Circular Economy. Processes 10, 518. https://doi.org/10.3390/pr10030518

Lendelová, J., Žitňák, M., Bošanský, M., Šimko, M., Piterka, P., 2016. Testing of property changes in recycled bedding for dairy cows. Res. Agric. Eng. 62, S44–S52. https://doi.org/10.17221/45/2016-RAE

Leso, L., Barbari, M., Lopes, M.A., Damasceno, F.A., Galama, P., Taraba, J.L., Kuipers, A., 2020. Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. Journal of Dairy Science 103, 1072–1099. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16864

Li, Y., Achinas, S., Zhao, J., Geurkink, B., Krooneman, J., Willem, E., Gerrit, J., 2020. Co-digestion of cow and sheep manure: Performance evaluation and relative microbial activity. Renewable Energy, Elsevier vol. 153(C), p. 553-563. https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.041

Llonch, L., Gordo, C., López, M., Castillejos, L., Ferret, A., Balanyà, T., 2021. Agronomic Characteristics of the Compost-Bedded Pack Made with Forest Biomass or Sawdust. Processes 9, 546. https://doi.org/10.3390/pr9030546

Lukumbuzya, M., Kristensen, J.M., Kitzinger, K., Pommerening-Röser, A., Nielsen, P.H., Wagner, M., Daims, H., Pjevac, P., 2020. A refined set of rRNA-targeted oligonucleotide probes for in situ detection and quantification of ammonia-oxidizing bacteria. Water Research 186, 116372. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116372

Maeda, K., Miyatake, F., Asano, R., Nakajima, K., Maeda, T., Iwabuchi, K., 2018. Response of the denitrifier community and its relationship with multiple N2O emission peaks after mature compost addition into dairy manure compost with forced aeration. Chemosphere 206, 310–319. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.169

Matturro, B., Rossetti, S., Leitão, P., 2021. CAtalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization (CARD-FISH) for Complex Environmental Samples, in: Azevedo, N.F., Almeida, C. (Eds.), Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH) for Microbial Cells, Methods in Molecular Biology. Springer US, New York, NY, pp. 129–140. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1115-9_9

Meng, L., Li, W., Zhang, S., Zhang, X., Zhao, Y., Chen, L., 2021. Improving sewage sludge compost process and quality by carbon sources addition. Sci Rep 11, 1319. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79443-3

Meng, Q., Xu, X., Zhang, W., Men, M., Xu, B., Deng, L., Bello, A., Jiang, X., Sheng, S., Wu, X., 2019. Bacterial community succession in dairy manure composting with a static composting technique. Can. J. Microbiol. 65, 436–449. https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0560

Mengistu, D., Sori, G., Mohammed, A., 2023. Assessment of Nutrient Contents of Compost Prepared by Farmers in BunoBedele Zone, South Western Oromia, Ethiopia. AJAF. https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20231102.11

Mitiohlo, L.V., Merzlov, S.V., Merzlova, H.V., Babenko, S.P., 2023. Content of micro elements in cereal and legume straw under the biotechnology of its composting. SCIVP 24, 100–111. https://doi.org/10.36359/scivp.2023-24-2.11

Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. Appl Environ Microbiol 62, 2156–2162. https://doi.org/10.1128/aem.62.6.2156-2162.1996

Neher, D.A., Andrews, T.D., Weicht, T.R., Hurd, A., Barlow, J.W., 2022. Organic Farm Bedded Pack System Microbiomes: A Case Study with Comparisons to Similar and Different Bedded Packs. Dairy 3, 587–607. https://doi.org/10.3390/dairy3030042

Nemet, F., Perić, K., Lončarić, Z., 2021. Microbiological activities in the composting process: A review. Columella 8, 41–53. https://doi.org/10.18380/SZIE.COLUM.2021.8.2.41

Ofner-Schröck, E., Zähner, M., Huber, G., Guldimann, K., Guggenberger, T., Gasteiner, J., 2015. Compost Barns for Dairy Cows—Aspects of Animal Welfare. OJAS 05, 124–131. https://doi.org/10.4236/ojas.2015.52015

Oliveira, C. E. A., Damasceno, F. A., Ferraz, G. A. S., Nascimento, J. A. C. D., Vega, F. A. O., Tinôco, I. F. F., & Andrade, R. R. (2021). Assessment of spatial variability of bedding variables in compost bedded pack barns with climate control system. Annals of the Brazilian Academy of Sciences, 93(3), e20200384. https://doi.org/10.1590/0001-3765202120200384

Oren, A., Garrity, G.M., 2021. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 71. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005056

Ouyang, Y., Norton, J.M., 2020. Nitrite Oxidizer Activity and Community Are More Responsive Than Their Abundance to Ammonium-Based Fertilizer in an Agricultural Soil. Front. Microbiol. 11, 1736. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01736

Patel, K., Godden, S.M., Royster, E., Crooker, B.A., Timmerman, J., Fox, L., 2019. Relationships among bedding materials, bedding bacteria counts, udder hygiene, milk quality, and udder health in US dairy herds. Journal of Dairy Science 102, 10213–10234. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16692

Pilatti, J.A., Vieira, F.M.C., Rankrape, F., Vismara, E.S., 2019. Diurnal behaviors and herd characteristics of dairy cows housed in a compost-bedded pack barn system under hot and humid conditions. animal 13, 399–406. https://doi.org/10.1017/S1751731118001088

Porcellato, D., Meisal, R., Bombelli, A., Narvhus, J.A., 2020. A core microbiota dominates a rich microbial diversity in the bovine udder and may indicate presence of dysbiosis. Sci Rep 10, 21608. https://doi.org/10.1038/s41598-020-77054-6

Qiao, C., Penton, C.R., Liu, C., Tao, C., Deng, X., Ou, Y., Liu, H., Li, R., 2021. Patterns of fungal community succession triggered by C/N ratios during composting. Journal of Hazardous Materials 401, 123344. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123344

Qiao, C., Ryan Penton, C., Liu, C., Shen, Z., Ou, Y., Liu, Z., Xu, X., Li, R., Shen, Q., 2019. Key extracellular enzymes triggered high-efficiency composting associated with bacterial community succession. Bioresource Technology 288, 121576. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121576

Ray, T., Gaire, T.N., Dean, C.J., Rowe, S., Godden, S.M., Noyes, N.R., 2022. The microbiome of common bedding materials before and after use on commercial dairy farms. anim microbiome 4, 18. https://doi.org/10.1186/s42523-022-00171-2

Robles, I., Kelton, D.F., Barkema, H.W., Keefe, G.P., Roy, J.P., Von Keyserlingk, M.A.G., DeVries, T.J., 2020. Bacterial concentrations in bedding and their association with dairy cow hygiene and milk quality. Animal 14, 1052–1066. https://doi.org/10.1017/S1751731119002787

Rose, A., Padovan, A., Christian, K., Van De Kamp, J., Kaestli, M., Tsoukalis, S., Bodrossy, L., Gibb, K., 2021. The Diversity of Nitrogen-Cycling Microbial Genes in a Waste Stabilization Pond Reveals Changes over Space and Time that Is Uncoupled to Changing Nitrogen Chemistry. Microb Ecol 81, 1029–1041. https://doi.org/10.1007/s00248-020-01639-x

Shi, M., Zhao, Y., Zhu, L., Song, X., Tang, Y., Qi, H., Cao, H., Wei, Z., 2020. Denitrification during composting: Biochemistry, implication and perspective. International Biodeterioration & Biodegradation 153, 105043. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2020.105043

Silva, D.J, Queiroz, A.C., 2006. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos, 3. ed. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 235p.

Silva, A.L., Araújo, R.D.C.C., Rodrigues, M., Souza, Á.I.A.F.E., Cruz, W.P.D., 2020. Composting and vermicomposting residues of açaí and babassu for sustainable agriculture in Amazon. CA 29, 217–231. https://doi.org/10.32929/2446-8355.2020v29n2p217-231

Silva, G.G.B.S., Ferraz, P.F.P., Damasceno, F.A., Zotti, M.L.A.N., Barbari, M., 2022. Compost Barns: A Bibliometric Analysis. Animals 12, 2492. https://doi.org/10.3390/ani12192492

Sun, Z.-Y., Zhang, J., Zhong, X.-Z., Tan, L., Tang, Y.-Q., Kida, K., 2016. Production of nitrate-rich compost from the solid fraction of dairy manure by a lab-scale composting system. Waste Management 51, 55–64. https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.03.002

Tsutsui, H., Fujiwara, T., Matsukawa, K., Funamizu, N., 2013. Nitrous oxide emission mechanisms during intermittently aerated composting of cattle manure. Bioresource Technology 141, 205–211. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.071

Van Kessel, M.A.H.J., Speth, D.R., Albertsen, M., Nielsen, P.H., Op Den Camp, H.J.M., Kartal, B., Jetten, M.S.M., Lücker, S., 2015. Complete nitrification by a single microorganism. Nature 528, 555–559. https://doi.org/10.1038/nature16459

Varma, V.S., Dhamodharan, K., Kalamdhad, A.S., 2018. Characterization of bacterial community structure during in-vessel composting of agricultural waste by 16S rRNA sequencing. 3 Biotech 8, 301. https://doi.org/10.1007/s13205-018-1319-7

Wagner, M., Rath, G., Koops, H.-P., Flood, J., Amann, R., 1996. In situ analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. Water Science and Technology 34, 237–244. https://doi.org/10.2166/wst.1996.0377

Wang, Y., Gong, J., Li, Jiaxin, Xin, Y., Hao, Z., Chen, C., Li, H., Wang, B., Ding, M., Li, W., Zhang, Z., Xu, P., Xu, T., Ding, G.-C., Li, Ji, 2020. Insights into bacterial diversity in compost: Core microbiome and prevalence of potential pathogenic bacteria. Science of The Total Environment 718, 137304. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137304

Wiraswati, S.M., Pramono, H., Oedjijono, O., Dini Ryandini, Dyah Fitri Kusharyati, Meyta Pratiwi, Taruna Dwi Satwika, Dwiana Muflihah Yulianti, Saefuddin Aziz, Daniel Joko Wahyono, Rizal Khoirun Alfisah, Yuriza Eshananda, Budi Rustomo, Afifah Mariana, 2023. Keragaman Morfologi Bakteri Nitrifikasi Asal Kompos Kotoran Domba pada Peternakan Domba dengan Sistem Bedding. Biotropic 7, 21–30. https://doi.org/10.29080/biotropic.v7i1.1695

Wu, H., Wang, Y., Dong, L., Hu, H., Meng, L., Liu, H., Zheng, N., Wang, J., 2020. Microbial Characteristics and Safety of Dairy Manure ComPosting for Reuse as Dairy Bedding. Biology 10, 13. https://doi.org/10.3390/biology10010013

Xiong, J.-Q., Kurade, M.B., Kim, J.R., Roh, H.-S., Jeon, B.-H., 2017. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga Chlamydomonas mexicana. Journal of Hazardous Materials 323, 212–219. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.04.073

Xu, Z., Li, R., Wu, S., He, Q., Ling, Z., Liu, T., Wang, Q., Zhang, Z., Quan, F., 2022. Cattle manure compost humification process by inoculation ammonia-oxidizing bacteria. Bioresource Technology 344, 126314. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126314

Yamamoto, N., Nakai, Y., 2019. Microbial Community Dynamics During the Composting Process of Animal Manure as Analyzed by Molecular Biological Methods, in: Hurst, C.J. (Ed.), Understanding Terrestrial Microbial Communities, Advances in Environmental Microbiology. Springer International Publishing, Cham, pp. 151–172. https://doi.org/10.1007/978-3-030-10777-2_6

Yang, Z., Guan, Y., Bello, A., Wu, Y., Ding, J., Wang, L., Ren, Y., Chen, G., Yang, W., 2020. Dynamics of ammonia oxidizers and denitrifiers in response to compost addition in black soil, Northeast China. PeerJ 8, e8844. https://doi.org/10.7717/peerj.8844

Yokokawa, T., Nagata, T., 2005. Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. Appl Environ Microbiol 71, 6799–6807. https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6799-6807.2005

Zhang, Q., Liu, J., Guo, H., Li, E., Yan, Y., 2019. Characteristics and optimization of dairy manure composting for reuse as a dairy mattress in areas with large temperature differences. Journal of Cleaner Production 232, 1053–1061. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.397

3. CAPÍTULO 2 – ARQUEIAS METANOGÊNICAS EM CAMA DE SISTEMA DE CRIAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DO TIPO *COMPOST BARN*: HETEROGENEIDADE E MANEJO

3.1 RESUMO

Arqueias metanogênicas normalmente são distribuídas em agregados de sítios anóxicos. Camas de sistema de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn* possuem aglomerados de diferentes tamanhos que podem modificar com o tempo e manejo. A passagem de trator nestes sistemas revolve, mistura e conduz a uma maior homogeneização do tamanho dos agregados da cama. O presente estudo teve por objetivo analisar a densidade e a proporção de arqueias metanogênicas das ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales, espacial e temporalmente, na cama de um sistema CB, através da técnica de hibridização *in situ* fluorescente. Amostras da cama foram coletadas quinzenalmente, durante dois meses desde a instalação do sistema, e mais uma 18 meses depois. Nesta última coleta, amostragens foram realizadas para quantificar estas arqueias metanogênicas, em diferentes profundidades, antes e após o revolvimento da cama por um trator. Densidades encontradas na superfície da cama foram ainda correlacionadas com medidas de fluxo de metano e dióxido de carbono. As densidades e proporções de arqueias das ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales apresentaram heterogeneidade espacial e temporal, com maiores valores de coeficiente de variação encontrados na primeira coleta e 18 meses depois antes da passagem do trator. Neste primeiro momento (T1), as densidades e proporções de Methanosarcinales foram dez vezes menores que as encontradas nos momentos de coletas seguintes (T2 e T3). Após 18 meses de funcionamento do sistema, a densidade de arqueias de ambas as ordens aumentou uma ordem de grandeza. Entretanto, suas proporções permaneceram abaixo de 6% (mínimo 0% e máximo 5,9%). Apenas a densidade de Methanobacteriales diferiu com o manejo. Maiores densidades foram encontradas após revolvimento pelo trator. Já a densidade de Methanosarcinales correlacionou com a concentração de dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4). Os resultados indicam que as arqueias metanogênicas na cama deste sistema *compost barn* possuem uma distribuição heterogênea no tempo e no espaço. Indicam, também, que o manejo influencia, aumentando a dispersão desta distribuição. E, ainda, sugerem que existe uma relação entre número de arqueias metanogênicas e fluxo de CO_2 e CH_4. O conhecimento da dinâmica das arqueias metanogênicas contribui para a elucidação dos processos de emissões de gases de efeito estufa nesses sistemas de produção, bem como adoção de melhores práticas de manejo.

Palavras-chave: Metanogênese, microssítios anóxicos, GEE, FISH, produção leiteira.

3.2 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, houve um crescimento exponencial na identificação de novas espécies, gêneros e táxons de alto nível de Archaea e Bacteria - Era Dourada de descobertas da Microbiologia [1,2]. Isto criou a necessidade de nomear, classificar e, muitas vezes, reagrupar taxonomicamente milhões de procariotos [3]. Neste ano de 2024, foram validados novos reinos de arqueias com diferentes filos [4]. A divisão anterior, Euryarchaeota, inclui agora os reinos Methanobacteriati, Nanobdellati e Thermoproteati. O novo filo Methanobacteriota possui vasta diversidade de metanogênicos, presentes principalmente nas ordens Methanobacteriales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanopyrales, Methanococcales e Methanocellales [1,5]. Arqueias metanogênicas são ainda encontradas na ordem candidata Methanomassiliicoccales do novo filo Thermoplasmatota [6]. As descobertas de genomas completos e quase completos levantam, também, a possibilidade de que outras linhagens metanogênicas divergentes aguardam descoberta [7]. Embora historicamente vistos como um metabolismo especializado, descobertas sugerem que a metanogênese pode ser um dos metabolismos mais antigos da Terra [8].

A abundância, atividade e distribuição de arqueias metanogênicas se dá em diferentes escalas espaciais e temporais. Acreditava-se que emissões de metano aconteciam somente em regiões anóxicas, uma vez que o oxigênio inibe sua produção. Recentemente, estudos indicaram maiores emissões de metano próximas à superfícies oxigenadas ou com oscilações redox [9–12]. Uma das explicações para esse paradoxo é que surjam nesses ambientes microssítios com anoxia local e/ou temporal [13].

Muitos microrganismos tendem a formar colônias, biofilmes e tendem a se agregar, com diferenciação de propriedades e processos em nanoescalas a macroescalas [14]. Microagregados são mais estáveis do que os macroagregados [15]. Heterogeneidade espacial em microescala é uma das explicações para a manutenção da alta diversidade de espécies microbianas. As flutuações ambientais podem contribuir para a alta diversidade ao mudar as condições mais rápido do que as espécies podem se extinguir [16]. Em solos, por exemplo, a maior quantidade de células microbianas é restrita a microhabitats muito pequenos [15,17,18].

Assim como nos agregados de solo, esterco e zonas com matéria orgânica particulada acumulada possuem ambientes de grande atividade e diversidade microbiana (*hotspot*) [14,19,20]. Estes ambientes são compartimentos espacialmente separados com atividade biológica aumentada. O tamanho deles varia em até quatro ordens de magnitude, ou seja, de

alguns micrômetros até vários milímetros. Nos ambientes de *hotspots*, os microrganismos se tornam ativos durante curtos momentos após as limitações serem removidas. Estes eventos de curto prazo, ou sequências de eventos que aceleram os processos microbianos em comparação às taxas médias são denominados de *hot moments*. Eles ocorrem ou levam à formação de *hotspots*, mas os *hotspots* não desaparecem necessariamente no final destes momentos. Eles podem manter alguns parâmetros de atividade microbiana em alto nível por períodos mais longos. A natureza efêmera dos *hotspots* em microescala e sua distribuição irregular contribuem, juntas, para um ambiente altamente dinâmico [14,21]. A maior abundância e biomassa nos *hotspots* são principalmente de microrganismos ativos [22,23].

Flutuações ambientais podem afetar as funções de algumas populações microbianas diferentemente. A regularidade destas flutuações impacta substancialmente a composição e o metabolismo microbiano [16]. As respostas microbianas às flutuações ambientais ocorrem, também, em escalas de tempo específicas, indo de milissegundos a dias [24]. As camas de sistemas de criação de vacas leiteiras do tipo *compost barn* são exemplos de sucessão ecológica com modificações dinâmicas nas comunidades de procariotos e fungos ao longo do tempo. Além dessas mudanças graduais e progressivas, há constante deposição de dejetos e urina proporcionando a entrada de microrganismos alóctones, do microbioma animal [9]. A deposição de urina promove outras alterações na cama, como o aumento da compactação e da umidade, que consequentemente leva a geração de regiões anóxicas [25]. Assim, o manejo adequado do sistema, incluindo o revolvimento da cama, ventilação adequada e controle de fatores físico-químicos é crucial para manter a eficiência da compostagem [26]. Geralmente, há um padrão nas flutuações ambientais de origem antrópica geradas pela passagem de tratores (três a quatro vezes por dia). Já a reposição da cama, ou parte dela, é uma flutuação variável de acordo com características específicas em cada sistema.

A transição de células ativas para inativas, e vice-versa, é também resultado de fatores físico-químicos. Entretanto, a ativação pode ser dependente da densidade populacional através do *quorum sensing* [14,27,28]. A hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e suas variações têm sido usada na determinação da densidade de procariotos específicos em diferentes ambientes [18,29–31]. No presente estudo, utilizamos a FISH para quantificar a densidade de arqueias metanogênicas das ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales na cama de um sistema CB. Além da distribuição espacial e temporal, avaliamos ainda a densidade destas arqueias na cama antes e após a passagem de trator e, também, correlacionamos com medidas de metano e dióxido de carbono.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no sistema de produção de vacas leiteiras do tipo *compost barn* (CB) da fazenda Experimental da Embrapa Gado de Leite, localizada no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, Brasil. O sistema entrou em funcionamento em março de 2020. Ele possui uma área de cama de 1.200 m^2 composta por maravalha de eucalipto. Lateralmente, possui corredor de passagem, corredor de alimentação e corredor de serviço, todos com piso de concreto. O galpão é equipado com sistema de ventilação por pressão negativa em túnel, com placas defletoras anguladas a 45° a partir do teto; as laterais são fechadas em lona, em uma das extremidades há 12 conjuntos de exaustores e na extremidade oposta há uma placa evaporativa em forma de colmeia. A cama é revolvida três vezes ao dia por um trator equipado com um avassalador. As vacas, das raças Holandês e Girolando, são organizadas na área de cama em quatro lotes distintos, com tamanho e número de animais variável. As vacas são categorizadas nos lotes de acordo com sua fase produtiva, sendo elas pré e pós-parto (L1), alta produção (L2), média produção (L3) e baixa produção (L4), respeitando uma área média de 12 m^2 por animal e um máximo de 100 animais, tornando os lotes dinâmicos temporalmente.

Amostras foram coletadas em 12 pontos aleatórios na superfície da cama, três pontos por lote, quinzenalmente desde sua instalação até dois meses de funcionamento do sistema (T1 a T5). Após 18 meses de funcionamento, uma nova coleta foi realizada em cada lote (quatro pontos aleatórios em cada), em duas profundidades (20 cm e 40 cm), antes e depois de revolvimento pelo trator. As quatro amostras coletadas com auxílio de uma escavadeira manual em cada lote, profundidade e passagem do trator, foram homogeneizadas em uma sacola plástica. Posteriormente, uma amostra composta foi retirada para análise microbiológica e de outros parâmetros em laboratório. Dentre estes parâmetros de caracterização da cama, no momento da coleta, o pH e teor de umidade (9,14 e 37%, respectivamente) foram mensurados, assim como a temperatura média da cama (47 ºC). Gases de efeito estufa, especificamente metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2), também foram mensurados nesta coleta através de um analisador de gases portátil (UGGA, Los Gatos Research Inc.) acoplado a uma câmara estática na superfície da cama, por três minutos (Melo Júnior et al, em preparação). Apenas os dados coletados no mesmo momento da coleta de amostras da cama foram utilizados nas análises, isto é, valores médios de gases mensurados nas câmaras em três pontos de cada lote, antes e depois do revolvimento pelo trator na superfície da cama.

Arqueias metanogênicas, das ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales, foram quantificadas por meio da técnica de Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com a utilização de sondas específicas (Tabela 1). As amostras foram inicialmente pesadas (0,5 g), fixadas em

paraformaldeído (2%), sonicadas (110 Hz por um minuto, repetido três vezes), centrifugadas (1111 rpm por cinco minutos, repetido três vezes) e filtradas em membranas de policarbonato (0,2 μm). Estes filtros foram cortados e cobertos com sondas diluídas em soluções de hibridização contendo concentração de formamida específicas. Após hibridização em estufa à 42 ºC, por aproximadamente 18 horas, os filtros foram colocados em soluções de lavagem com concentrações de cloreto de sódio também específicas (Tabela 1). A quantificação de arqueias metanogênicas e de procariotos totais foi feita em um microscópio de epifluorescência (Olympus IX-71), equipado com filtros Chroma U-MWU2 e U-MWG2, em dez campos aleatórios com ampliação de 1000X.

Tabela 1: Sondas específicas utilizadas para análise da composição da comunidade de arqueias metanogênicas e concentração de formamida na solução de hibridização.

Sonda	Especificidade	Sequência (5'- 3')	Formamida (%)	Referência
MB311	Methanobacteriales	ACC TTG TCT CAG GTT CCA TCT CC	30	[32]
MSMS860	Methanosarcinales	GGC TCG CTT CAC GGC TTC CCT	45	[29]
NON	Controle negativo	TAG TGA CGC CGT CGA	30	[33]

As análises descritivas das densidades de arqueias e suas proporções em relação ao total de procariotos foram realizadas. As comparações espaciais e temporais destas densidades e proporções foram feitas através de análise de variância (ANOVA Two-Way) adotando um nível de significância de $p < 0,05$. Quando diferenças significativas foram identificadas ($p < 0,05$), o teste de comparações múltiplas de Tukey foi aplicado para determinar quais grupos diferiam entre si. E, ainda, foram conduzidas análises de correlação entre densidades de arqueias metanogênicas e concentração de gases (CH_4 e CO_2). O coeficiente de correlação (r) foi considerado fraco (> 0,3 a 0,5); moderado (> 0,5 a 0,7), forte (> 0,7 a 0,9) e muito forte (> 0,9 a 1). Os testes foram realizados usando o software SigmaPlot (versão 12.0) e Rstudio (versão 4.4.0), adotando um nível de significância de $p < 0,05$, bem como a construção de gráficos (ggplot2).

3.4 RESULTADOS

Uma variabilidade na densidade de arqueias quantificadas pelas sondas específicas para as ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales foi observada ao longo das diferentes coletas

realizadas em intervalos de quinze dias durante dois meses (Tabela 2). O maior coeficiente de variação foi encontrado na primeira coleta no início do funcionamento do sistema com a introdução das vacas. Neste início, foi encontrada a menor densidade média de arqueias Methanosarcinales (0,02 ± 0,03 10^8 cél g^{-1}), diferenciando das duas coletas seguintes (T2 e T3) em uma ordem de grandeza. Já a densidade de arqueias quantificadas pela sonda específica para a ordem Methanobacteriales não apresentou diferença ao longo deste tempo (T1 a T5). Também, não houve diferença na densidade destas arqueias entre os lotes (Figura 1). Entretanto, foram observados, na dispersão de dados de ambos os grupos de arqueias, valores discrepantes (*outliers*), com maiores medianas entre quinze e 30 dias (T2 e T3) (Tabela 2).

Tabela 2: Valores descritivos e de dispersão das densidades de arqueias da ordem Methanobacteriales (MB) e Methanosarcinales (MS) em amostras da cama coletadas quinzenalmente por dois meses.

Coleta	**Média ± Desvio Padrão**		**Máximo**		**Mínimo**		**Mediana**		**Coeficiente variação (%)**	
	(x 10^8 g^{-1})									
	MB	MS	MB	MS	MB	MS	MB	MS	MB	MS
T1	0,1 ± 0,25	0,02 ± 0,03[a]	0,85	0,07	0,00	0,00	0,002	0,000	248	155
T2	0,18 ± 0,19	0,21 ± 0,14[b]	0,70	0,55	0,05	0,08	0,131	0,199	105	66
T3	0,14 ± 0,10	0,18 ± 0,12[b]	0,29	0,41	0,00	0,00	0,141	0,158	69	68
T4	0,11 ± 0,15	0,11 ± 0,11[ab]	0,49	0,40	0,00	0,00	0,054	0,088	140	102
T5	0,12 ± 0,14	0,12 ± 0,11[ab]	0,37	0,33	0,00	0,00	0,047	0,081	116	97

a, b, ab diferença $p < 0,05$

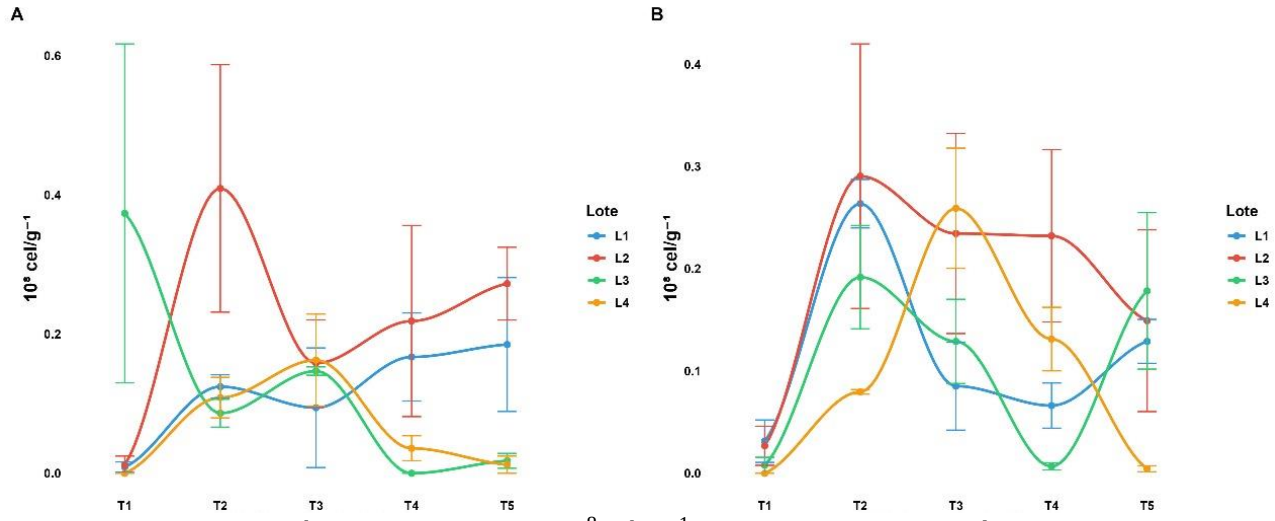


Figura 1. Densidade média e erro padrão (10^8 cél g^{-1}) de arqueias metanogênicas das ordens Methanobacteriales (A) e Methanosarcinales (B) na superfície da cama em três pontos de cada lote (L1, L2, L3, L4) durante dois meses de funcionamento do sistema.

As proporções médias de ambos os grupos de arqueias em relação ao total de procariotos foi inferior a 6%, com valores máximos de Methonobacteriales (5,04%) encontrados na primeira coleta e de Methanosarcinales (4,09%) na coleta de um mês (T3). Assim como as densidades médias, foram encontrados valores discrepantes nas proporções destas arqueias, com maior coeficiente de variação na primeira coleta para ambas as ordens (259% e 142%). Maiores valores de mediana foram encontrados em T2 e T3, sendo respectivamente 0,6% e 0,7% para Methanobacteriales, 0,7% e 1,2% para Methanosarcinales. As proporções de Methanosarcinales na instalação do sistema (T1) foram diferentes das proporções encontradas com 15 e 30 dias de funcionamento (T2 e T3). Já as proporções de arqueias da ordem Methanobacteriales não apresentaram diferenças ao longo dos dois meses (Figura 2).

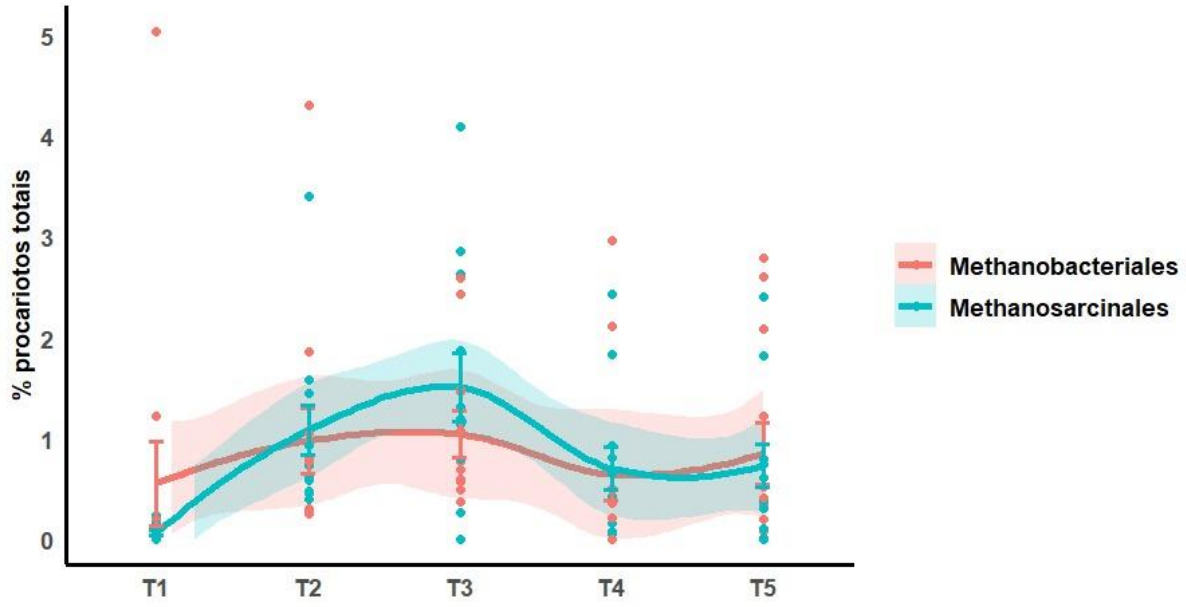


Figura 2. Proporção média e erro padrão (barras) da densidade Methanobacteriales e Methanosarcinales em relação ao total de procariotos ao longo do tempo. Os pontos representam os valores observados em cada amostra. Áreas sombreadas ao redor das linhas representam o intervalo de confiança de 95%.

Houve um aumento de dez vezes no número de arqueias metanogênicas da cama após 18 meses de funcionamento do sistema, com variações nestas densidades antes e após o revolvimento pelo trator (Figura 3). Entretanto, a proporção destas arqueias em relação ao total de procariotos permaneceu abaixo de 6% (Figura 4). Considerando todos os dados de densidade e proporção de ambos os grupos de arqueias, independente das profundidades, as maiores amplitudes e medianas foram encontradas após o revolvimento e o maior coeficiente de variação antes da passagem do trator. Os valores de mediana das densidades de Methanobacteriales antes da passagem do trator foram 0,45 x 10^8 g^{-1} e após 6,66 x 10^8 g^{-1}. Enquanto, os valores para Methanosarcinales foram 0,15 x 10^8 g^{-1} e 4,39 x 10^8 g^{-1}, respectivamente antes e depois. Valor máximo encontrado (12,7 x 10^8 g^{-1}) foi de arqueias do grupo Methanosarcinales após revolvimento. Este padrão encontrado não se repetiu analisando as profundidades independentes de antes ou depois do revolvimento. Maiores valores e coeficiente de variação ocorreram em 20 cm de profundidade para as proporções de ambas arqueias. Já as densidades apresentaram valores próximos de amplitude para as Methanosarcinales (11,5 x 10^8 g^{-1} em 20 cm e 12,7 x 10^8 g^{-1} em 40 cm) e de coeficientes de variação para Methanobacteriales (91% em 20 cm e 99% em 40 cm). Analisando os dois fatores

separadamente e suas interações (revolvimento e profundidade), maior densidade de Methanobacteriales foi encontrada após a passagem do trator em ambas as profundidades (Figura 3). Não houve diferença nas densidades de Methanosarcinales e nem nas proporções de ambas arqueias em relação ao total de procariotos (Figura 3 e 4).

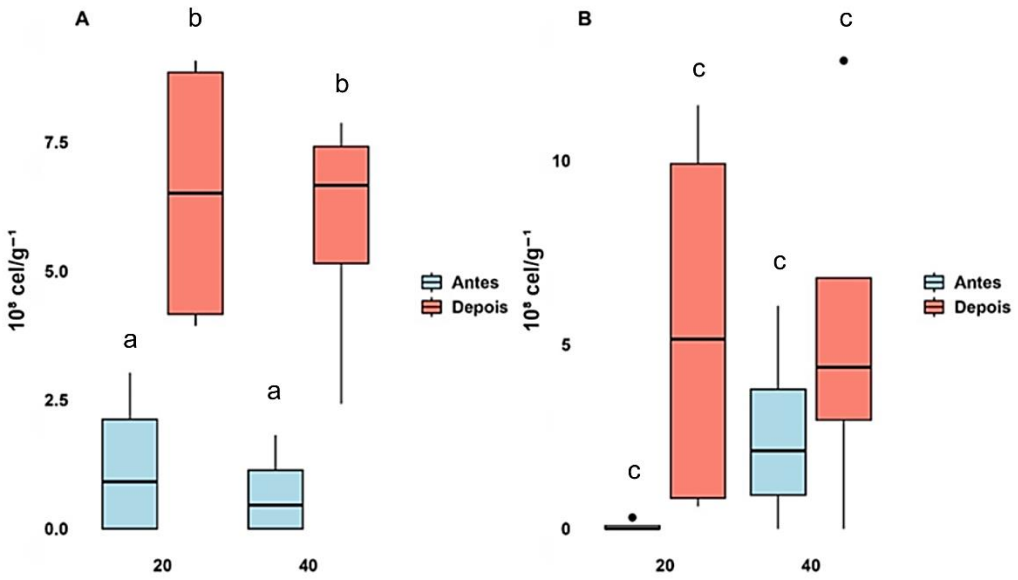


Figura 3: Densidades de arqueias da ordem Methanobacteriales (A) e Methanosarcinales (B) nas profundidades de 20 cm e 40 cm, antes e depois do revolvimento da cama com 18 meses de instalação do sistema. Caixas representam o intervalo interquartil, linha central representa a mediana e pontos representam os outliers.

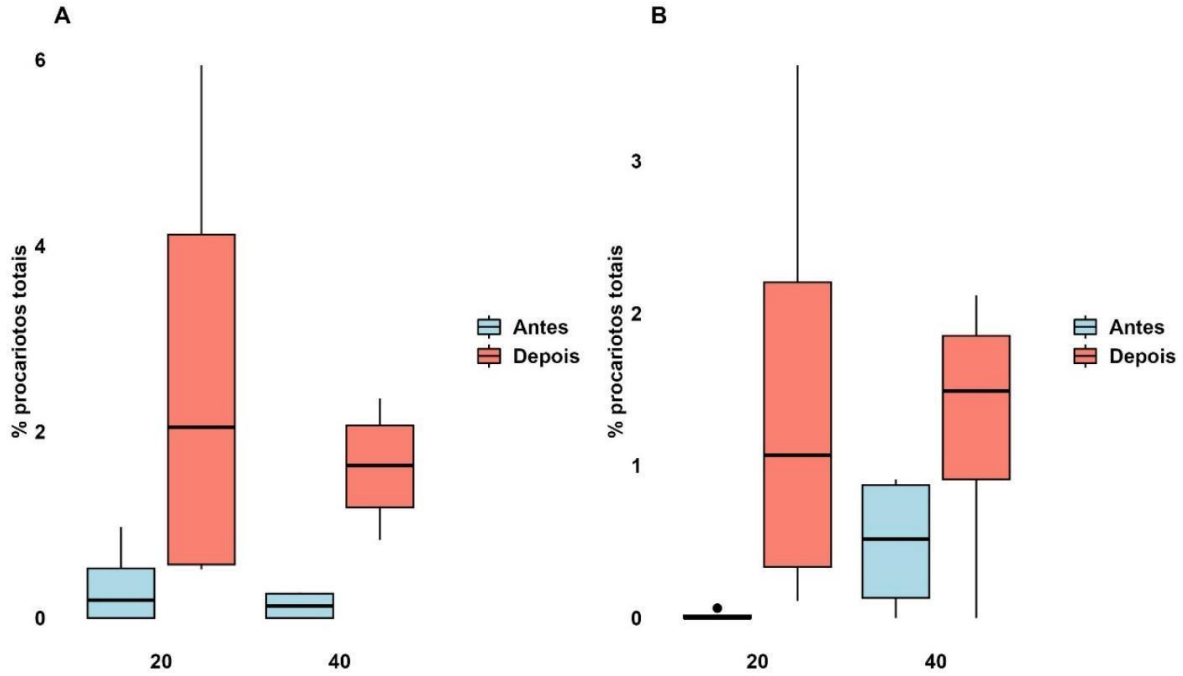


Figura 4: Proporções de Methanobacteriales (A) e Methanosarcinales (B) nas profundidades de 20 cm e 40 cm, antes e depois do revolvimento da cama com 18 meses de instalação do sistema. Caixas representam o intervalo interquartil, linha central representa a mediana e pontos representam os outliers.

Não houve diferença nas concentrações de metano e dióxido de carbono mensurados (dados não mostrados) antes e após a passagem do trator. A densidade de Methanosarcinales apresentou correlação positiva moderada com concentração de dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4). Methanobacteriales não se correlacionou com os gases mensurados (Figura 4).

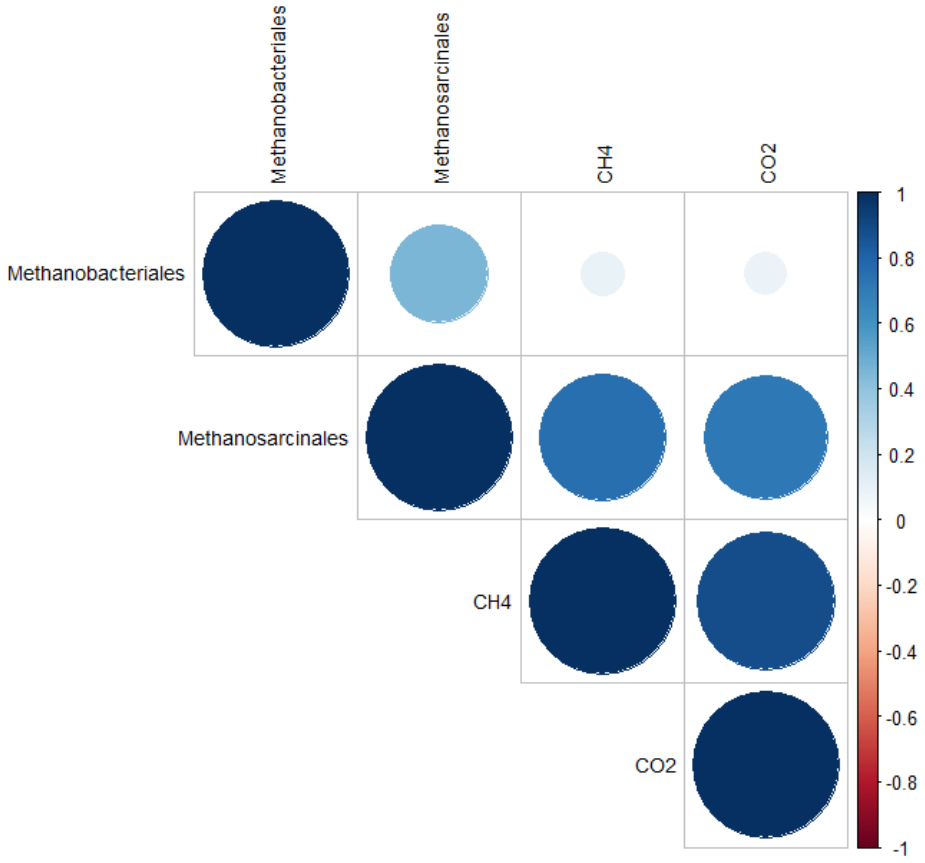


Figura 5: Matriz de correlação entre valores médios da densidade de arqueias metanogênicas (ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales), e valores médios do fluxo de metano (CH_4) e dióxido de carbono (CO_2) na superfície da cama antes e após revolvimento. Coeficiente de correlação (r): fraco (> 0,3 a 0,5); moderado (> 0,5 a 0,7), forte (> 0,7 a 0,9) e muito forte (> 0,9 a 1).

3.5 DISCUSSÃO

Pesquisas sobre comunidades de arqueias em diferentes ambientes revelaram variações espaço-temporais significativas em sua abundância e composição [9,12]. Entender a adaptação de arqueias metanogênicas a diferentes perturbações, requer exploração e correlações entre a composição da comunidade e as condições do ambiente [34,35]. Os resultados deste estudo demonstram variações nas densidades de arqueias quantificadas pelas sondas específicas para as ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales ao longo do tempo e manejo com passagem trator. As densidades das arqueias variaram entre 10^8 e 10^9 células e suas proporções ficaram abaixo de 10% da densidade média de procariotos na cama. A primeira coleta (T1) correspondeu à implementação do sistema, momento em que a cama era composta, em grande parte, por maravalha de eucalipto e poucas fezes. A cama era constituída até então por áreas com grandes regiões óxicas, devido a descompactação e baixa umidade do material. Nas

amostras coletadas no início, foram observadas diferenças na densidade de Methanosarcinales quando comparadas com as coletas seguintes (15 e 30 dias). Já quando comparadas com as amostras coletadas em 18 meses, a densidade dessas arqueias aumentou em duas ordens de grandeza. As densidades de arqueias da ordem Methanobacteriales diferiu apenas uma ordem de grandeza quando comparadas as coletas iniciais e com as finais. A dispersão dos dados em cada coleta, observada a partir da amplitude, mostram a variabilidade espacial. Como exemplo, temos a densidade de Methanobacteriales na primeira coleta, onde apenas uma amostra de um dos lotes (L3) apresentou discrepância com maior densidade.

O acúmulo de microrganismos alóctones, principalmente provenientes das vacas, e o crescimento daqueles já encontrados na cama (autóctones) resultaram em maiores densidades na última amostragem. Apesar desta diferença, não houve diferença nas proporções destas arqueias ao longo do tempo e com a passagem do trator. Dentro de cada ordem de arqueias existem diversas espécies com taxas de crescimento distintas. Outras arqueias e bactérias foram adicionadas ou cresceram na cama deste sistema. A respiração anaeróbica produz consideravelmente menos energia do que a respiração aeróbica, resultando em consumo de substrato e crescimento mais lento [36]. A formação de metano biogênico, quando solos aerados são incubados anoxicamente, atesta não apenas a presença de metanogênicos ativos, mas também a presença de muitos outros microrganismos anaeróbios. O metano é apenas o produto final em uma cascata de processos de degradação. Outros microrganismos viáveis precisam estar presentes [9]. Arqueias de uma amostra são resultado de suas condições anóxicas atuais, recentes e /ou passadas no histórico da amostra [18].

O potencial de oxirredução (redox) é um dos principais controles sobre os fluxos de metano na escala global - metanogênicos anaeróbios e metanotróficos aeróbios [13,37]. Microrganismos respondem às flutuações de oxigênio em diferentes tempos. As bactérias que oxidam o metano tendem a responder mais rapidamente do que arqueias metanogênicas. As arqueias respondem mais lentamente, particularmente em ambientes com excesso de carbono lábil e alta demanda biológica de oxigênio [38,39].

Além da concentração de oxigênio, a umidade está relacionada ao número de animais no sistema, já que é impactada pelo volume de urina depositada na cama. Uma maior área da cama para cada vaca holandesa no sistema deve ser considerada [40]. Segundo esses autores, essa proporcionalidade no espaço ocupado por essa raça auxilia na maior produção de leite e contribui para a secagem da cama. Uma maior quantidade de animais produz quantidades maiores de água nas fezes e na urina. A compactação da cama é diretamente afetada, também, com o número de animais e, consequentemente, a deposição constante de fezes e urina no

sistema. A cama pode reduzir a porosidade e diminuir a disponibilidade de oxigênio com a movimentação e o comportamento dos animais [40,41]. A compactação da cama devido a umidade excessiva ocasiona a formação de partículas de diferentes tamanhos, com aglomerados de fezes e material da cama. No sistema estudado, o número de animais foi variável nos lotes, respeitando a capacidade máxima de 100 animais por sistema, que foram ajustados para manter uma área de 12 m^2 por animal. A dinâmica dos lotes garantia a proporção adequada de metros por animal, sem delimitação fixa e definitiva para cada lote, já que foi dependente do número de animais em cada estágio de lactação. Devido às diferentes condições climáticas, a área recomendada de cama por vaca em CB no Brasil é de 10 a 12 m^2 para as regiões Centro-Oeste e Sudeste do país [40]. Não foram encontradas diferenças nas densidades e proporções de arqueias metanogênicas comparando estes lotes dinâmicos. Entretanto, os dados mantiveram grande variabilidade, indicando uma heterogeneidade na distribuição das arqueias na cama deste sistema.

O revolvimento da cama pelo trator é parte essencial para o bom funcionamento do sistema e viabilização da compostagem [42]. Este manejo pode ser considerado uma fonte de flutuações ambientais e perturbações para os microrganismos. A frequência é geralmente previsível, assim como são as mudanças na temperatura ajustadas por ventilação [14,43]. O trator não apresenta resolução micrométrica suficiente para homogeneizar e descompactar totalmente o sistema, embora haja um aumento na razão superfície:volume das partículas após sua passagem. Regiões anaeróbicas são mantidas em microescalas, por menor que se tornem os agregados da cama após o manejo. Essas microrregiões são favoráveis ao desenvolvimento das arqueias metanogênicas de forma ainda heterogênea [44]. A escala de tempo entre os revolvimentos pelo trator é insuficiente para prever aumentos e declínios populacionais na comunidade microbiana [16]. Logo, a mudança nas densidades de Methanobacteriales analisadas após a perturbação pelo trator pode ser atribuída em parte à descompactação dos agregados em macroescala. Acreditamos que a amplitude dos dados levou à ausência de diferença estatística da densidade de arqueias da ordem Methanosarcinales depois da passagem do trator. Além disso, a mediana mostrou uma tendência de aumento no valor da densidade de arqueias de ambas as ordens avaliadas. Consideramos a cama de CB como solo, que possui uma grande quantidade de células microbianas. E, que estas células têm localização restrita a microhabitats bem pequenos, que compreendem muito menos do que 1% da matriz total [17].

Mudanças no estado de hidratação afetam a dinâmica da comunidade microbiana e moldam os principais processos biogeoquímicos [45]. Os agregados de solo, por exemplo, podem ser considerados reatores biogeoquímicos e têm implicações para a troca de gases entre

solo e atmosfera. A reatividade destes agregados é regulada pelo seu tamanho, composição química e estrutura comunidade microbiana. Assim, a distribuição do tamanho de agregados é conhecida por ser um dos fatores que moldam as taxas de emissões de gases de efeito estufa [46,47]. Camas de CB tem diferentes estruturas, agregados de tamanho e forma heterogêneos. As variações no tamanho de agregados ocasionam variações no tamanho dos poros, possibilitando a ocorrência de diversos microhabitats. Os poros menores possuem menor oferta e demanda de oxigênio [48,49].

A produção de gases de efeito estufa (GEE) na pecuária é resultado, principalmente, da degradação de esterco e fermentação microbiana de material de alimentação celulósica eliminado através da eructação [50]. Atividades de pesquisa avaliando as emissões destes gases e de práticas de controle de suas emissões em instalações de gado leiteiras foram intensificadas nos últimos anos [51]. Estes autores compararam, dentre outras coisas, o número de publicações avaliando emissões de GEE e tipo de instalações. Destacaram que, por ser relativamente novo, os sistemas de criação do tipo *compost barn* têm atraído interesse de pesquisadores e produtores. A ventilação inadequada no sistema pode levar ao acúmulo de gases expelidos pelos animais, aumentando riscos à saúde dos animais. Sistemas de ventilação eficazes são cruciais para garantir que gases nocivos sejam continuamente removidos do ambiente interno de uma instalação. Modelos de instalação com laterais fechadas e ventilação negativa tem sido um grande desafio. Nestes modelos, a substituição do material de cama é realizada com maior frequência quando comparado às camas de sistemas CB com laterais abertas [52].

Cerca de 69% de todas as fontes de CH_4 são provenientes de processos microbianos [53]. Embora as arqueias sejam as principais produtoras de metano, nem sempre existe uma relação direta entre o número de indivíduos e a concentração deste gás. Por exemplo, Zhou e colaboradores [54] não encontraram relação entre a população total de metanogênicos ruminais e a produção entérica de metano em vacas lactantes. Eles sugeriram que a suplementação da dieta das vacas leiteiras aumentou a produção de CH_4 e alterou a composição da comunidade de metanogênicos do rúmen, mas não a densidade geral deles. Também não foram encontradas diferenças entre a estrutura da comunidade bacteriana e arqueias metanogênica do rúmen de vacas leiteiras separadas em grupos com alta e baixa emissões de CH_4 [55]. Embora a comunidade microbiana em ambos os grupos tenha sido representada, principalmente, por arqueias das ordens Methanobacteriales e Methanosarcinales. Em nosso estudo, apenas a ordem Methanosarcinales correlacionou-se com CH_4 e CO_2 de forma positiva moderada. Em digestores anaeróbios, arqueias desta ordem foram encontrados como predominantes, seguidos por ARC I, Methanomicrobiales e Methanobacteriales [56]. A atividade de Methanosarcinales

está intimamente ligada ao ciclo do carbono, utilizando CO_2 como substrato para a produção de metano. As condições ambientais que favorecem o crescimento de Methanosarcinales, como a disponibilidade de substratos orgânicos e a ausência de oxigênio, consequentemente podem favorecer a produção de CO_2 e CH_4. Methanobacteriales e Methanosarcinales possuem diferentes vias metabólicas para a produção de metano. Methanobacteriales utilizam principalmente hidrogênio e dióxido de carbono para a metanogênese, enquanto Methanosarcinales podem utilizar uma variedade de substratos, incluindo acetato [57,58]. Essas diferenças podem resultar em uma menor correlação de Methanobacteriales nas concentrações de CO_2 e CH_4. As interações entre Methanobacteriales e outras comunidades microbianas também podem influenciar a produção de metano de maneira complexa. As emissões de metano entérico de ruminantes resultam das interações complexas entre arqueias metanogênicas, protozoários ciliados, bactérias e fungos anaeróbicos [59].

A densidade de indivíduos não reflete necessariamente sua atividade metabólica. Arqueias podem estar presentes em grandes números, mas com baixa atividade, ou em menor número, mas altamente ativas. Nem todas as arqueias produzem o tempo todo e na mesma intensidade. Assim como a diversidade da comunidade microbiana não está diretamente relacionada à concentração de GEEs mensurados naquele momento. O metano produzido em microssítios anóxicos pode ser consumido por metanotróficos em outras partes dentro de um perfil de profundidade, ofuscando qualquer sinal detectável na superfície. Assim, no mesmo microssítio podem ser encontrados microrganismos produzindo e outros consumindo [18]. Em muitas fontes globais de metano provenientes de microrganismos, as taxas de produção são geralmente maiores do que as taxas de emissão, já que grande parte do metano produzido inicialmente é consumido por microrganismos antes de serem liberados à atmosfera [60,61]. Além disso, o metano mensurado pode não ser exclusivamente emitido pelas arqueias presentes na cama, mas também pode incluir o metano produzido e liberado do trato gastrointestinal das vacas, através de arrotos e flatulências. A densidade de arqueias não necessariamente reflete sua atividade metabólica. A correlação entre densidade e concentração de metano pode não ser direta. Alvarado-Raya e colaboradores [62] estudaram os efeitos do teor de umidade, pH e tamanho de partículas do composto de CB nas taxas de emissão de CH_4 e CO_2. Eles encontraram taxas de CH_4 e CO_2 aumentadas conforme o aumento do tamanho da partícula e o pH.

Nenhum habitat microbiano natural é verdadeiramente estável ou estático [16]. Flutuações ambientais e perturbações são características generalizadas da vida microbiana. Neste trabalho, evidenciamos que na cama do sistema CB, com microhabitats óxicos e anóxicos, favoreceram o desenvolvimento das comunidades de arqueias metanogênicas. Ao

longo do tempo, o acúmulo de fezes e urina e consequente aumento na compactação da cama levaram a alterações na comunidade de arqueias metanogênicas, que exibiram padrão de distribuição heterogênea. A passagem do trator, um elemento de perturbação intencional, mostrou-se eficaz para homogeneizar a cama e aumentar a descompactação, sendo possível observar o aumento na densidade de Methanobacteriales. Apesar dos avanços recentes sobre os processos microbianos envolvidos no ciclo global do metano, ainda há necessidade de maior compreensão da microbiota de camas de sistemas CB envolvida em cenários redox dinâmicos. Na sociedade atual, a conservação e gestão da biodiversidade é um desafio primário, principalmente no contexto agrícola, no qual práticas de manejo sustentável são cruciais para minimizar impactos ambientais.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Baker BJ, De Anda V, Seitz KW, Dombrowski N, Santoro AE, Lloyd KG. Diversity, ecology and evolution of Archaea. Nat Microbiol 2020; 5:887–900. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0715-z

[2] Pallen MJ, Telatin A, Oren A. The Next Million Names for Archaea and Bacteria. Trends in Microbiology 2021; 29:289–98. https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.10.009

[3] Pallen MJ. Valid publication of names for bacterial species from the chicken gut. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2024;74. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006445

[4] Göker M, Oren A. Valid publication of names of two domains and seven kingdoms of prokaryotes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2024;74. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.006242

[5] Thauer RK, Kaster A-K, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. Nat Rev Microbiol 2008; 6:579–91. https://doi.org/10.1038/nrmicro1931

[6] Xie F, Zhao S, Zhan X, Zhou Y, Li Y, Zhu W, et al. Unraveling the phylogenomic diversity of Methanomassiliicoccales and implications for mitigating ruminant methane emissions. Genome Biol 2024; 25:32. https://doi.org/10.1186/s13059-024-03167-0

[7] Vanwonterghem I, Evans PN, Parks DH, Jensen PD, Woodcroft BJ, Hugenholtz P, et al. Methylotrophic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. Nat Microbiol 2016; 1:16170. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.170

[8] Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB. Methanogenesis. Current Biology 2018;28: R727–32. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021

[9] Angel R, Claus P, Conrad R. Methanogenic archaea are globally ubiquitous in aerated soils and become active under wet anoxic conditions. The ISME Journal 2012; 6:847–62. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.141

[10] Angle JC, Morin TH, Solden LM, Narrowe AB, Smith GJ, Borton MA, et al. Methanogenesis in oxygenated soils is a substantial fraction of wetland methane emissions. Nat Commun 2017; 8:1567. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01753-4

[11] Bogard MJ, Del Giorgio PA, Boutet L, Chaves MCG, Prairie YT, Merante A, et al. Oxic water column methanogenesis as a major component of aquatic CH4 fluxes. Nat Commun 2014; 5:5350. https://doi.org/10.1038/ncomms6350

[12] Wen X, Yang S, Horn F, Winkel M, Wagner D, Liebner S. Global Biogeographic Analysis of Methanogenic Archaea Identifies Community-Shaping Environmental Factors of Natural Environments. Front Microbiol 2017; 8:1339. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01339

[13] Wilmoth JL, Schaefer JK, Schlesinger DR, Roth SW, Hatcher PG, Shoemaker JK, et al. The role of oxygen in stimulating methane production in wetlands. Global Change Biology 2021; 27:5831–47. https://doi.org/10.1111/gcb.15831

[14] Kuzyakov Y, Blagodatskaya E. Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. Soil Biology and Biochemistry 2015; 83:184–99. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.01.025

[15] Totsche KU, Amelung W, Gerzabek MH, Guggenberger G, Klumpp E, Knief C, et al. Microaggregates in soils. J Plant Nutr Soil Sci 2018; 181:104–36. https://doi.org/10.1002/jpln.201600451

[16] Nguyen J, Lara-Gutiérrez J, Stocker R. Environmental fluctuations and their effects on microbial communities, populations and individuals. FEMS Microbiology Reviews 2021;45: fuaa068. https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa068

[17] Young IM, Crawford JW, Nunan N, Otten W, Spiers A. Chapter 4 Microbial Distribution in Soils. Advances in Agronomy, vol. 100, Elsevier; 2008, p. 81–121. https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)00604-4

[18] Lacroix EM, Aeppli M, Boye K, Brodie E, Fendorf S, Keiluweit M, et al. Consider the Anoxic Microsite: Acknowledging and Appreciating Spatiotemporal Redox Heterogeneity in Soils and Sediments. ACS Earth Space Chem 2023; 7:1592–609. https://doi.org/10.1021/acsearthspacechem.3c00032

[19] Bundt M, Widmer F, Pesaro M, Zeyer J, Blaser P. Preferential flow paths: biological 'hot spots' in soils. Soil Biology and Biochemistry 2001; 33:729–38. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00218-2

[20] Petersen SO, Nielsen TH, Frostegård Å, Olesen t. Oxygen uptake, carbon metabolism, and denitrification associated with manure hot-spots. Soil Biology and Biochemistry 1996; 28:341–9

[21] Barcellos D, O'Connell CS, Silver W, Meile C, Thompson A. Hot Spots and Hot Moments of Soil Moisture Explain Fluctuations in Iron and Carbon Cycling in a Humid Tropical Forest Soil. Soil Systems 2018; 2:59. https://doi.org/10.3390/soilsystems2040059

[22] Marschner P, Marhan S, Kandeler E. Microscale distribution and function of soil microorganisms in the interface between rhizosphere and detritusphere. Soil Biology and Biochemistry 2012; 49:174–83. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.01.033

[23] Lee S-H, Jang I, Chae N, Choi T, Kang H. Organic Layer Serves as a Hotspot of Microbial Activity and Abundance in Arctic Tundra Soils. Microb Ecol 2013; 65:405–14. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0125-8

[24] Shamir M, Bar-On Y, Phillips R, Milo R. SnapShot: Timescales in Cell Biology. Cell 2016; 164:1302-1302.e1. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.058

[25] Lugo AE, Brown S, Brinson MM. Concepts in wetland ecology. Forested wetlands, Amsterdam, Netherlands: Lugo, A. E., Brown, S., Brinson, M. M.; 1990, p. 53–85

[26] Guesine GD, Silveira RMF, Silva IJOD. Physical and environmental characteristics of the compost barn system and its effects on the physical integrity, reproduction and milk production of dairy cattle: a scoping review. JABB 2023; 11:1–6. https://doi.org/10.31893/jabb.23010

[27] Rattray JB, Thomas SA, Wang Y, Molotkova E, Gurney J, Varga JJ, et al. Bacterial Quorum Sensing Allows Graded and Bimodal Cellular Responses to Variations in Population Density. mBio 2022;13: e00745-22. https://doi.org/10.1128/mbio.00745-22

[28] Marenda M, Zanardo M, Trovato A, Seno F, Squartini A. Modeling quorum sensing trade-offs between bacterial cell density and system extension from open boundaries. Sci Rep 2016; 6:39142. https://doi.org/10.1038/srep39142

[29] Raskin L, Poulsen LK, Noguera DR, Rittmann BE, Stahl DA. Quantification of methanogenic groups in anaerobic biological reactors by oligonucleotide probe hybridization. Appl Environ Microbiol 1994; 60:1241–8. https://doi.org/10.1128/aem.60.4.1241-1248.1994

[30] Matturro B, Rossetti S, Leitão P. CAtalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization (CARD-FISH) for Complex Environmental Samples. In: Azevedo NF, Almeida C, editors. Fluorescence In-Situ Hybridization (FISH) for Microbial Cells, vol. 2246, New York, NY: Springer US; 2021, p. 129–40. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1115-9_9

[31] Del'Duca A, Evangelista Cesar D, Galuppo Diniz C, Abreu PC. Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (Oreochromis niloticus) using the fluorescent in situ hybridization technique. Aquaculture 2013;388–391:115–21. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.01.019

[32] Crocetti G, Murto M, Björnsson L. An update and optimisation of oligonucleotide probes targeting methanogenic Archaea for use in fluorescence in situ hybridisation (FISH). Journal of Microbiological Methods 2006; 65:194–201. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.07.007

[33] Yokokawa T, Nagata T. Growth and Grazing Mortality Rates of Phylogenetic Groups of Bacterioplankton in Coastal Marine Environments. Appl Environ Microbiol 2005; 71:6799–807. https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6799-6807.2005

[34] Hedderich R, Whitman WB. Physiology and biochemistry of the methane-producing archaea. The Prokaryotes, New York, NY: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K., Stackebrandt, E.; 2006

[35] Lozupone CA, Knight R. Global patterns in bacterial diversity. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104:11436–40. https://doi.org/10.1073/pnas.0611525104

[36] Jin Q, Bethke CM. The thermodynamics and kinetics of microbial metabolism. American Journal of Science 2007; 307:643–77. https://doi.org/10.2475/04.2007.01

[37] Liptzin D, Silver WL. Spatial patterns in oxygen and redox sensitive biogeochemistry in tropical forest soils. Ecosphere 2015; 6:1–14. https://doi.org/10.1890/ES14-00309.1

[38] McLatchey GP, Reddy KR. Regulation of Organic Matter Decomposition and Nutrient Release in a Wetland Soil. J of Env Quality 1998; 27:1268–74. https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700050036x

[39] Teh YA, Silver WL, Conrad ME. Oxygen effects on methane production and oxidation in humid tropical forest soils. Global Change Biology 2005; 11:1283–97. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2005.00983.x

[40] Leso L, Barbari M, Lopes MA, Damasceno FA, Galama P, Taraba JL, et al. Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. Journal of Dairy Science 2020; 103:1072–99. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16864

[41] Shane EM, Endres MI, Johnson DG, Reneau JK. Bedding Options for an Alternative Housing System for Dairy Cows: A Descriptive Study. Applied Engineering in Agriculture 2010; 26:659–66. https://doi.org/10.13031/2013.32062

[42] Barberg AE, Endres MI, Janni KA. Compost Dairy Barns in Minnesota: A Descriptive Study. Applied Engineering in Agriculture 2007; 23:231–8. https://doi.org/10.13031/2013.22606

[43] Lodge DJ, McDowell WH, McSwiney CP. The importance of nutrient pulses in tropical forests. Trends in Ecology & Evolution 1994; 9:384–7. https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90060-4

[44] Janni KA, Endres, M.I., Reneau, J.K., Schoper, W.W. Compost Dairy Barn: Layout and Management Recommendations. Applied Engineering in Agriculture 2007; 23:97–102.

[45] Ebrahimi A, Or D. Dynamics of soil biogeochemical gas emissions shaped by remolded aggregate sizes and carbon configurations under hydration cycles. Global Change Biology 2018;24. https://doi.org/10.1111/gcb.13938

[46] Brewer PE, Calderón F, Vigil M, Von Fischer JC. Impacts of moisture, soil respiration, and agricultural practices on methanogenesis in upland soils as measured with stable

isotope pool dilution. Soil Biology and Biochemistry 2018; 127:239–51. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.09.014

[47] Wang B, Brewer PE, Shugart HH, Lerdau MT, Allison SD. Soil aggregates as biogeochemical reactors and implications for soil–atmosphere exchange of greenhouse gases—A concept. Global Change Biology 2019; 25:373–85. https://doi.org/10.1111/gcb.14515

[48] Lacroix EM, Rossi RJ, Bossio D, Fendorf S. Effects of moisture and physical disturbance on pore-scale oxygen content and anaerobic metabolisms in upland soils. Science of The Total Environment 2021; 780:146572. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146572

[49] Andreote FD, Cardoso EJBN. Introdução à biologia do solo. Microbiologia do solo. 2ª ed., Piracicaba: Cardoso, E. J. B. N.; Andreote, F. D.; 2016, p. 9–22.

[50] Bačėninaitė D, Džermeikaitė K, Antanaitis R. Global Warming and Dairy Cattle: How to Control and Reduce Methane Emission. Animals 2022; 12:2687. https://doi.org/10.3390/ani12192687

[51] Ferraz PFP, Ferraz GAES, Ferreira JC, Aguiar JV, Santana LS, Norton T. Assessment of Ammonia Emissions and Greenhouse Gases in Dairy Cattle Facilities: A Bibliometric Analysis. Animals 2024; 14:1721. https://doi.org/10.3390/ani14121721

[52] Andrade RR, Tinôco IDFF, Damasceno FA, Oliveira CEA, Concha MS, Zacaroni ODF, et al. Understanding Compost-Bedded Pack Barn Systems in Regions with a Tropical Climate: A Review of the Current State of the Art. Animals 2024;14:1755. https://doi.org/10.3390/ani14121755

[53] Conrad R. The global methane cycle: recent advances in understanding the microbial processes involved. Environ Microbiol Rep 2009; 1:285–92. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00038.x

[54] Zhou M, Chung Y-H, Beauchemin KA, Holtshausen L, Oba M, McAllister TA, et al. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive: Rumen methanogens and methane production in dairy cows. Journal of Applied Microbiology 2011; 111:1148–58. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05126.x

[55] Danielsson R, Dicksved J, Sun L, Gonda H, Müller B, Schnürer A, et al. Methane Production in Dairy Cows Correlates with Rumen Methanogenic and Bacterial Community Structure. Front Microbiol 2017;8. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226

[56] Guermazi-Toumi S, Chouari R, Sghir A. Molecular analysis of methanogen populations and their interactions within anaerobic sludge digesters. Environmental Technology 2019; 40:2864–79. https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1455747

[57] Mand TD, Metcalf WW. Energy Conservation and Hydrogenase Function in Methanogenic Archaea, in Particular the Genus *Methanosarcina*. Microbiol Mol Biol Rev 2019;83: e00020-19. https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-19

[58] Kurth JM, Op Den Camp HJM, Welte CU. Several ways one goal—methanogenesis from unconventional substrates. Appl Microbiol Biotechnol 2020; 104:6839–54. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10724-7

[59] Magaço FDS, Duarte ER. Interação microbiana e metanogênese em ruminantes – uma revisão. Med Vet (UFRPE) 2019; 13:88. https://doi.org/10.26605/medvet-v13n1-2615

[60] Frenzel P. Plant-Associated Methane Oxidation in Rice Fields and Wetlands. In: Schink B, editor. Advances in Microbial Ecology, vol. 16, Boston, MA: Springer US; 2000, p. 85–114. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4187-5_3

[61] Reeburgh WS. Global methane biogeochemistry. Treatise on Geochemistry, Vol. 4: The Atmosphere, Oxford, UK: Keeling, R. F., Holland, H. D., Turekian, K. K.; 2003, p. 65–89.

[62] Alvarado-Raya HE. JLT. Factores Regulatorios para las Emisiones de Metano y Dióxido de Carbono a Partir de Compostas. Anais do V Congreso Internacional y XIX Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México, México: 2017.

4. CAPÍTULO 3 – MICROBIOMA DE CAMAS DE CRIAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS DO TIPO *COMPOST BARN*: DIVERSIDADE BACTERIANA E RELAÇÃO COM FLUXO DE METANO

4.1 RESUMO

As comunidades microbianas são essenciais para os ciclos biogeoquímicos e a regulação do clima, influenciando significativamente os gases de efeito estufa. O aumento da demanda por produtos de origem animal tem intensificado as emissões de metano e outros gases, agravando problemas ambientais. O sistema *compost barn* (CB) para vacas leiteiras, que promove a compostagem de dejetos, surge como uma solução sustentável, mas o estudo detalhado da microbiota envolvida ainda é desafiador e crucial para a sustentabilidade agropecuária. Diante disso, a microbiota de amostras de camas de CB de fazendas brasileiras, com diferentes características, foi analisada através do sequenciamento do gene 16S rRNA. A diversidade de microrganismos foi estudada, assim como os grupos diferencialmente abundantes entre as fazendas com alto e baixo fluxo de metano, sobretudo grupos que possivelmente correlacionam com altos e baixos fluxos de metano. Os resultados mostraram variações significativas na composição microbiana entre as fazendas, com predominância de filos como Actinobacteriota e Proteobacteria e dos gêneros *Halomonas*, *Marinobacter*, *Ornithinicoccus* e *Sphaerobacter*. Diferenças na abundância de táxons em relação ao fluxo de metano foi observada. A ordem Actinomarinales apresentou maior abundância nas fazendas com alto fluxo de metano, enquanto Thermomicrobiales, Euzebyaceae, *Ornithinicoccus*, *Nocardioides*, *Corynebacterium* entre outros, apresentaram maior abundância nas fazendas com baixo fluxo. A análise metataxonômica revelou a singularidade de cada cama amostrada, além de ASVs não identificadas, evidenciando a importância na continuidade de estudos sobre os microbiomas. Este é um importante passo na tentativa de desvendar o desconhecido e melhor compreender a diversidade microbiana ambiental.

Palavras-chave: Microbioma, 16S rRNA, gases de efeito estufa.

4.2 INTRODUÇÃO

As comunidades microbianas são fundamentais para a manutenção da vida na terra, desempenhando papéis cruciais nos ciclos biogeoquímicos e na regulação do clima [1,2]. Os microrganismos são seres ubíquos e os mais diversos. Eles produzem e consomem os principais gases de efeito estufa, e suas atividades podem tanto exacerbar quanto mitigar os efeitos das

mudanças climáticas [3]. Os microrganismos do solo desempenham um papel crucial na sustentabilidade e produtividade dos agroecossistemas [4].

O crescimento exponencial da população mundial nas últimas décadas tem gerado uma série de desafios para a produção de alimentos. Consequentemente, a demanda por produtos de origem animal como o leite e a carne, também cresce significativamente. A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2023) [5], estimou que 32% do metano de emissões do setor agrícola é originado da pecuária. Os 11% do total de gases de efeito estufa (GEE) produzidos mundialmente, com papel dominante de emissões de ruminantes, é excretado na atmosfera através da respiração e eructação [6–8]. Além disso, as grandes quantidades de esterco animal produzidas na indústria pecuária levam a sérios problemas ambientais [9], e o acúmulo e descarte inadequado podem levar à poluição atmosférica, do solo e da água [10,11].

O *compost barn* (CB) surgiu como um sistema de alojamento alternativo para vacas leiteiras, oferecendo benefícios para o bem-estar animal e qualidade do leite, e tem sido cada vez mais usado em todo o mundo [12–14]. A cama de descanso dos animais, composta por matéria orgânica, permite o processo de compostagem, devido a aeração do sistema, constante deposição de dejetos e urina e controle do ambiente, como a temperatura e umidade, promovendo uma sucessão dinâmica de microrganismos. A compostagem é importante na estabilização de resíduos agrícolas e pecuários por comunidades microbianas, que estão presentes durante todo o processo [15–17]. No entanto, devido a uma grande parte de microrganismos não serem cultivados *in vitro*, o estudo da comunidade microbiana do CB ainda é desafiador [18]. Conhecer a microbiota do CB e reconhecer a atividade microbiana como parte fundamental é essencial para a implementação e manutenção de manejos agrícolas sustentáveis. Leso e colaboradores (2020), em recente revisão [19], evidenciaram que, embora todos os CB já descritos compartilham características semelhantes, diferenças notáveis podem ser encontradas entre os sistemas em diferentes países e climas, o que reforça a hipótese de que cada sistema apresenta uma microbiota única.

O avanço das metodologias de sequenciamento bem como das análises de dados tem auxiliado na detecção de microrganismos anteriormente desconhecidos, permitindo o estudo da dinâmica e função de populações microbianas em grande profundidade. Além disso, as análises moleculares têm revelado diferenças significativas dentro de comunidades microbianas que não seriam detectáveis usando metodologias baseadas em cultivo [20]. O presente estudo analisa a diversidade da microbiota de diferentes camas de sistema *compost barn* através do sequenciamento do gene 16S rRNA, com diferentes tipos de materiais de composição e idade da cama, investigando grupos bacterianos diferencialmente abundantes entre as fazendas.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Área de estudo e coleta de amostras

As amostras do estudo foram coletadas em seis camas de diferentes fazendas (uma cama por fazenda) com sistema de produção de vacas leiteiras do tipo *compost barn* (CB) nas cidades brasileiras de Coronel Pacheco/MG (F1), Araxá/MG (F2), Patos de Minas/MG (F3), Carmo do Paranaíba/MG (F4), Silvânia/GO (F5) e Cachoeira Dourada de Minas/MG (F6), entre novembro de 2022 a maio de 2023. A temperatura atmosférica durante as coletas variou entre 20 e 26°C.

A raça das vacas era Holandês, exceto na Fazenda 6, que era Girolando. Esta fazenda também se diferenciou por utilizar, além de maravalha como as demais, mistura de terra e esterco seco. A Tabela 1 apresenta as características de cada fazenda, como dimensões, número de animais e idade da cama. A caracterização das camas foi complementada com dados físicos e químicos mensurados durante a coleta, ou através de análises laboratoriais específicas. São eles: temperatura da cama, pH, macroelementos (carbono/C e nitrogênio/N) e teor de umidade. Também foram medidos os fluxos de metano e dióxido de carbono com um analisador de gases portátil – UGGA, Los Gatos Research Inc. (Melo Júnior et al. em preparação).

Tabela 1: Caracterização do CB das fazendas amostradas. Valores ausentes estão representados por um traço simples (-). C e N representados por média ± DP.

Local	N° total de vacas	Tamanho da cama (m^2)	Idade da cama (dias)	Temperatura da cama (°C)	Teor de umidade (%)	pH	C orgânico total (g/kg)	N total (g/kg)
F1	94	1.222	960	47	37	9,14	24,9 ± 1,59	- *
F2	93	784	1.080	37	37	9,17	46,55 ± 6,23	2,46 ± 0,78
F3	117	864	180	35	55	8,59	82,15 ± 5,81	3,53 ± 0,80
F4	415	3.787	180	47	34	8,24	59,89 ± 8,62	3,67 ± 1,44
F5	163	1.950	720	38	39	8,78	53,44 ± 4,34	53,66 ± 0,26
F6	-	-	720	42	28	8,75	44,77 ± 4,61	0,55 ± 0,20

*não calculado, maioria dos valores abaixo do limite de detecção (<0,04 g/Kg)

Amostras da cama foram coletadas em 16 pontos aleatórios com o auxílio de uma escavadeira manual em duas profundidades: de 0 até 20 cm e de 20 cm até 40 cm. As amostras de cada fazenda (16) foram misturadas e homogeneizadas antes da retirada de três réplicas de

uma amostra composta. As amostras foram armazenadas e congeladas em tubos estéreis de 50mL previamente identificados.

4.3.2 Preparação da amostra e extração de DNA

O DNA microbiano foi extraído das amostras (250 mg) usando o kit DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. A concentração de DNA foi determinada com o espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific) e posteriormente armazenado em freezer a -20 °C. Uma alíquota de 24 µL de DNA extraído de cada réplica foi enviada para amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA em empresa terceirizada, a fim de determinar o perfil taxonômico das comunidades microbianas. A região V3-V4 do gene 16S rRNA foi amplificada usando o par de primers 341F (5′-CCTAYGGGRBGCASCAG-3′) e 806R (5′-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3′) [21]. A partir do *amplicon* as bibliotecas foram construídas, normalizadas e sequenciadas de maneira paired end (2 x 250 pb) utilizando a plataforma Miseq (Illumina).

4.3.3 Análise de dados da microbiota

Os arquivos FASTQ brutos foram analisados para a observação da qualidade dos dados. As sequências variantes de *amplicon* (Amplicon Sequence Variants, ASV) foram inferidas usando o método DADA2 (versão 1.28). Este pipeline de análise também incluiu o controle de qualidade das sequências, correção de erros e remoção de sequências quiméricas [22]. A taxonomia foi atribuída às ASVs usando um método de classificador Bayesiano, alinhando ao banco de dados SILVA (versão 138) [23]. As análises de diversidade e a produção de figuras foram realizadas através de pacotes implementados no Software R [24], incluindo phyloseq [25] e ggplot2 [26]. Uma análise de escala multidimensional (NMDS) baseado em uma matriz de dissimilaridade Bray-Curtis foi usada para comparar as estruturas da comunidade microbiana entre as amostras. Para testar as diferenças na composição da comunidade microbiana (NMDS), foi usada a análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) nas distâncias de Bray-Curtis. Utilizamos o DESeq2 [27] para identificar ASVs diferencialmente abundantes, em comparações par a par, entre as fazendas, através das contagens absolutas de *reads* em teste de Wald. As fazendas foram divididas em grupos baseado nos seguintes parâmetros: idade da cama (inicial, média e bem estabelecida); fluxo de CO_2 (baixo, médio e alto); nitrogênio total (baixo e alto); fluxo de metano (alto e baixo). As ASVs obtidas ($p < 0,01$) foram avaliadas individualmente a fim de excluir falsos positivos.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Estrutura e diversidade da comunidade microbiana

A análise de rarefação das amostras sequenciadas, que considera a riqueza de ASVs em função do rendimento de sequências do gene 16S rRNA, mostra que o esforço do sequenciamento foi suficiente para capturar a diversidade presente nas amostras, já que todas as curvas obtidas tendem a atingir uma assíntota (Figura 1).

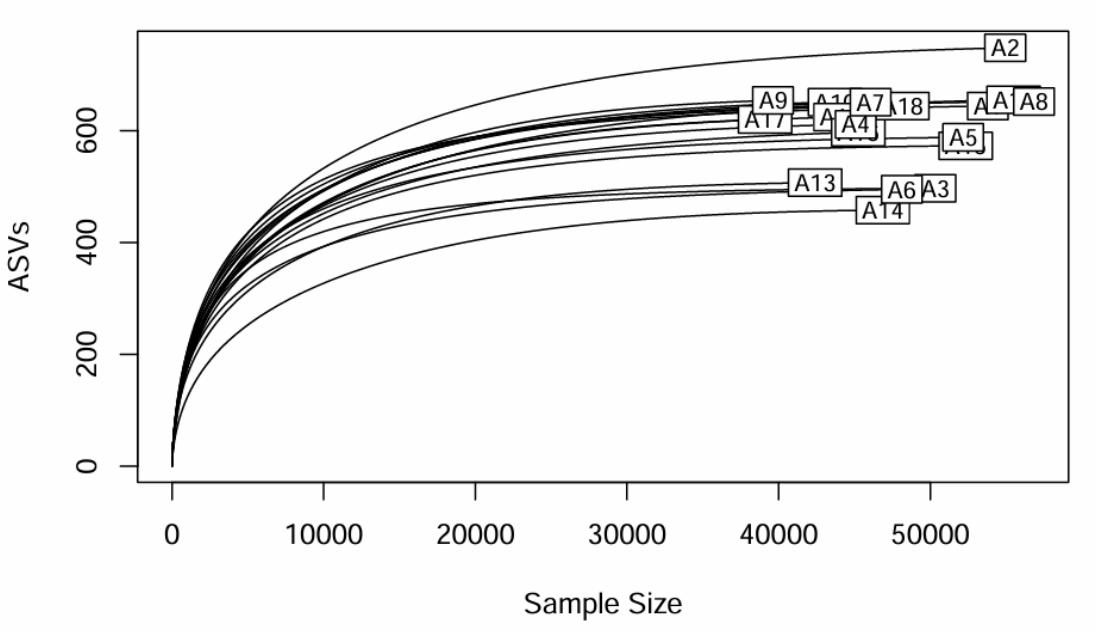


Figura 1 – Curvas de rarefação das amostras em função do número de sequências variantes de *amplicons* (ASVs) do gene 16S rRNA e o número de sequências obtidas pelo sequenciamento.

Através do sequenciamento do gene 16S rRNA e a inferência das ASVs pudemos analisar a diversidade e o perfil taxonômico da comunidade microbiana de cada amostra coletada nas diferentes fazendas (F1 a F6). Um total de 864.422 sequências de alta qualidade foram utilizadas para inferir a microbiota das amostras de cama das fazendas. As sequências foram classificadas em 5.645 ASVs, dentre essas, 626 estavam presentes em pelo menos 20% das amostras. O índice de Chao1 nas fazendas foi de 459,05 a 754,61, indicando uma ampla variação de riqueza nas amostras coletadas (Figura 2A). Quanto à diversidade das amostras, de acordo com o índice de Shannon, os valores variaram de 3,37 a 4,55, indicando diversidade amostral e na comunidade (Figura 2B). No entanto, os valores do índice de Simpson, que variaram entre 0,90 (F5) e 0,98 (F2), sugerem alta dominância em algumas amostras, indicando que embora haja diversidade na comunidade, algumas espécies dominam (Figura 2C).

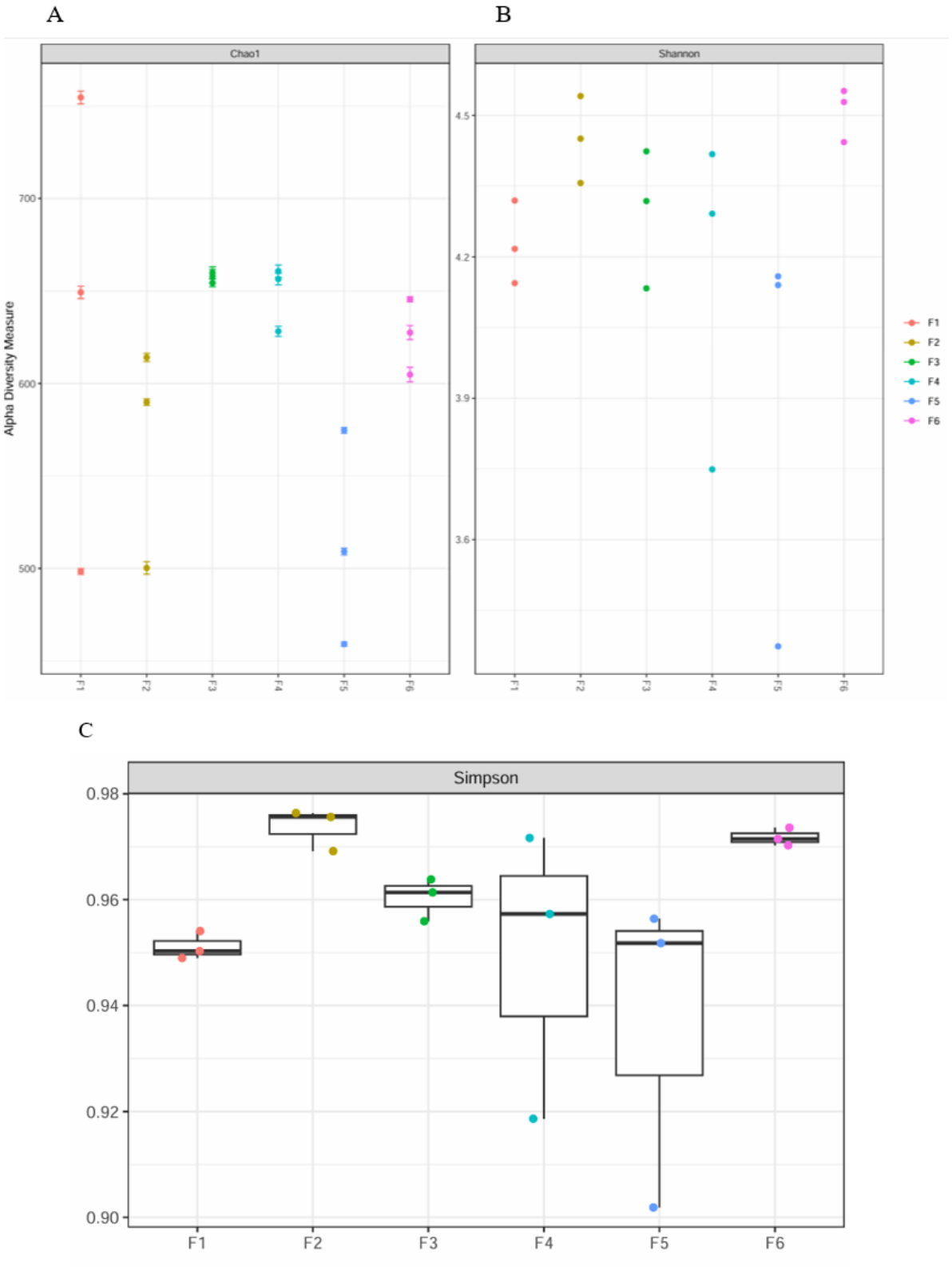


Figura 2 – Análise da diversidade alfa nas seis fazendas (F1 a F6). Chao1 (A) foi utilizado como estimador de riqueza e Shannon (B) como estimador de diversidade. Simpson foi utilizado como estimador de dominância (C).

A diversidade beta (Figura 3) mostrou que a comunidade microbiana das triplicatas era muito similar, com exceção das amostras das fazendas F4 e F5, evidenciando, ainda, a diferença na composição e estrutura da microbiota entre fazendas (PERMANOVA na dissimilaridade de Bray-Curtis p=0,001).

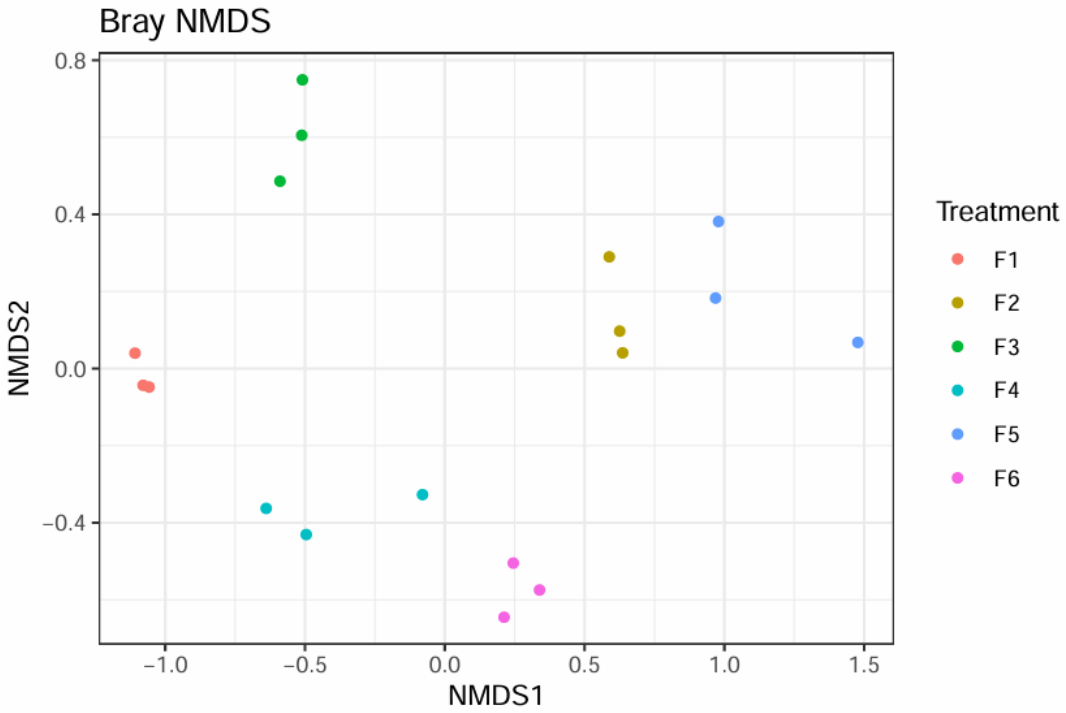


Figura 3 – Análise da diversidade beta das amostras das camas das seis fazendas (F1 a F6). O gráfico de escala multidimensional (NMDS) baseou-se na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis. As triplicatas são representadas pela mesma cor dentro de cada fazenda.

4.4.2 Composição taxonômica da comunidade microbiana

Os membros de Actinobacteriota foram os filos mais abundantes identificados em todas as amostras (Figura 4), variando de 25% (F5) a 70% (F6) (Figura 4). Dentro deste grupo taxonômico, a família Intransporangiaceae esteve presente em todas as amostras (Figura 5). Além de Actinobacteriota, Proteobacteria (variando de 3% na F4 a 54% na F5), Chloroflexi (variando de 9% na F3 a 34% na F4) e Firmicutes (variando de 2% na F5 a 32% F4) apresentaram também grande prevalência. Famílias dentro destes grupos taxonômicos se destacaram pela presença em todas ou grande parte das amostras, são elas: Bacillaceae (pertencente a Firmicutes) presente em todas as amostras, Halomonadaceae e Marinobacteraceae (pertencentes a Proteobacteria) nas fazendas F2 a F6. Além das famílias anteriormente citadas, Thermomicrobiaceae (pertencente a Thermomicrobiota) também se destaca pela presença em todas as amostras. Houve, ainda, ASVs não atribuídas a nível de

família (NA) entre as dez mais abundantes, indicando a ausência de assinatura taxonômica a elas (Figura 5).

Já os filos Acidobacteriota, Bacteroidota, Deinococcota, Desulfobacteriota, Gemmatimonadota e Myxococcota apresentaram baixa prevalência, abaixo de 7% em todas as amostras. Ainda assim, esses filos demonstram grande variação entre as amostras e fazendas. Acidobacteriota apresentou prevalência mais alta na F1 (aproximadamente 0,53%) às demais, se diferenciando até mesmo dentro das triplicatas da mesma fazenda, onde estava ausente na F6. O filo Deinococcota, apresentou maior abundância nas fazendas F1 (aproximadamente 2%) e F3 (aproximadamente 2,7%), demonstrando, mesmo que em baixa abundância comparada às mais prevalentes, variações capazes de diferenciar a microbiota das fazendas.

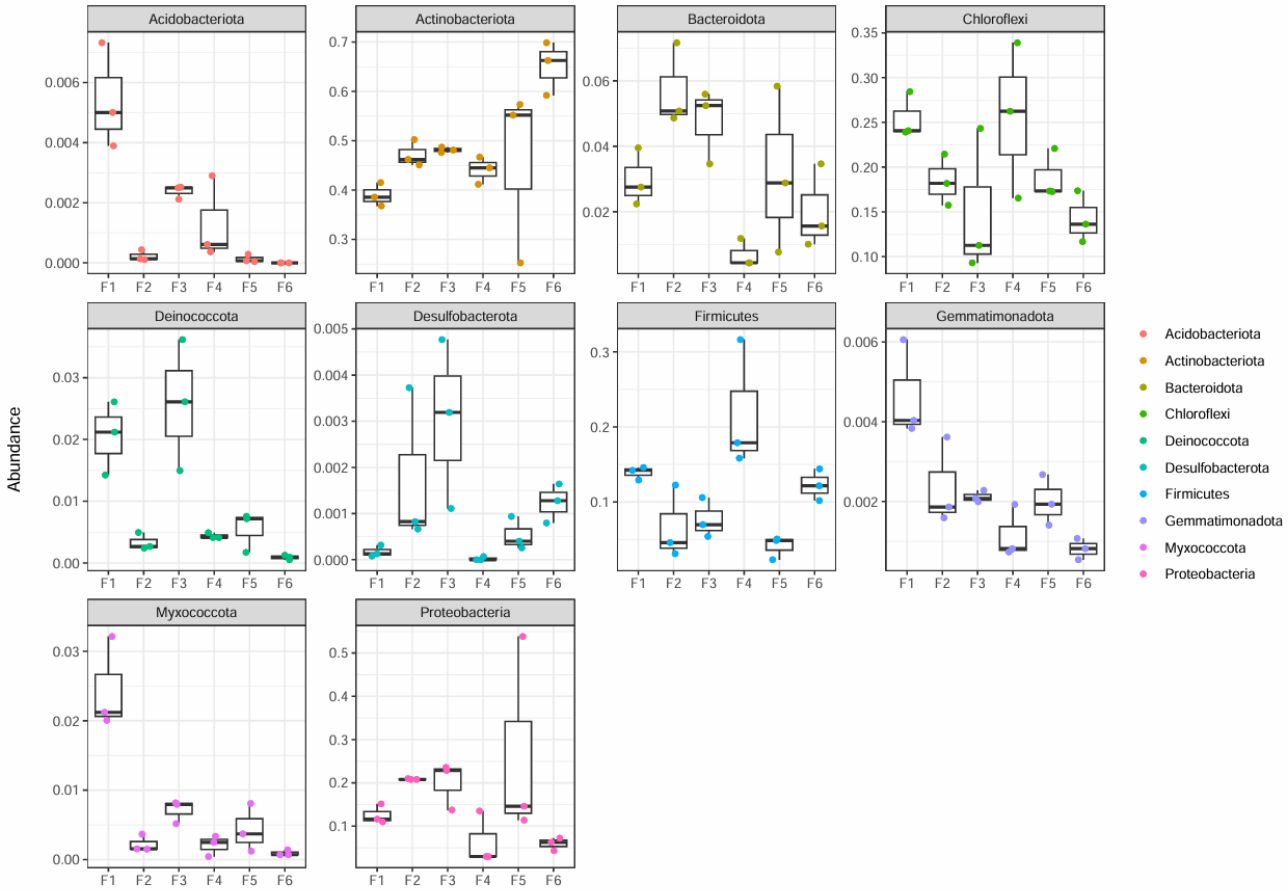


Figura 4 – Boxplot de abundância relativa (%), a nível de filo, da microbiota, nas amostras de cama das seis fazendas (F1 a F6).

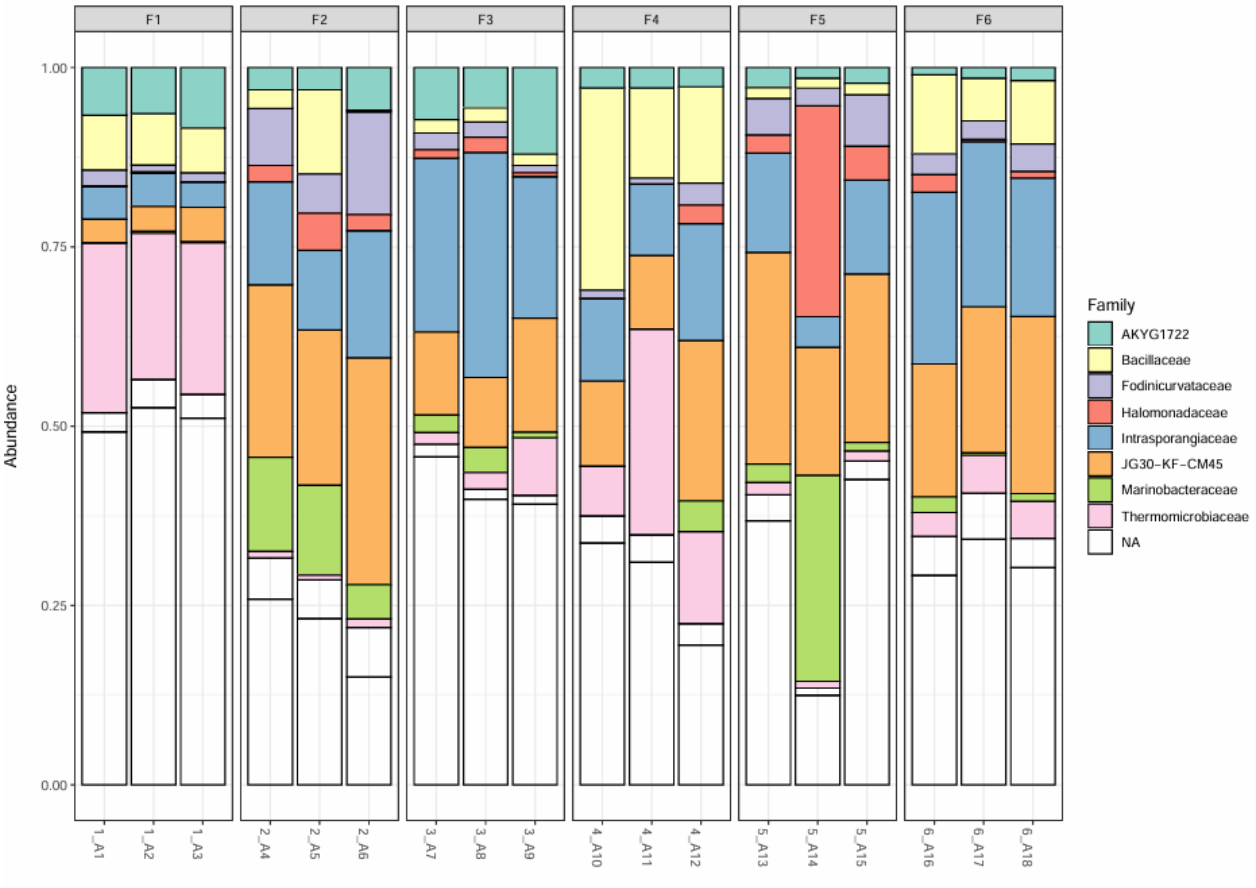


Figura 5 – Gráfico de barras de abundância relativa (%) em nível de família. Os NAs correspondem às ASVs sem assinatura taxonômica atribuídas a nível de família.

Os gêneros *Halomonas*, *Marinobacter*, *Ornithinicoccus* e *Sphaerobacter* foram identificados como os mais abundantes nas fazendas (Figura 6), aparecendo como predominantes em pelo menos uma das amostras analisadas. As ASVs não atribuídas a um gênero específico (NA) constituem a maior parcela da microbiota das amostras das fazendas. Ao remover as ASVs não atribuídas, é possível identificar outros gêneros abundantes, como *Amaricoccus, Georgenia, Longispora, Nocardioides, Sinibacillus* e *Truepera.*

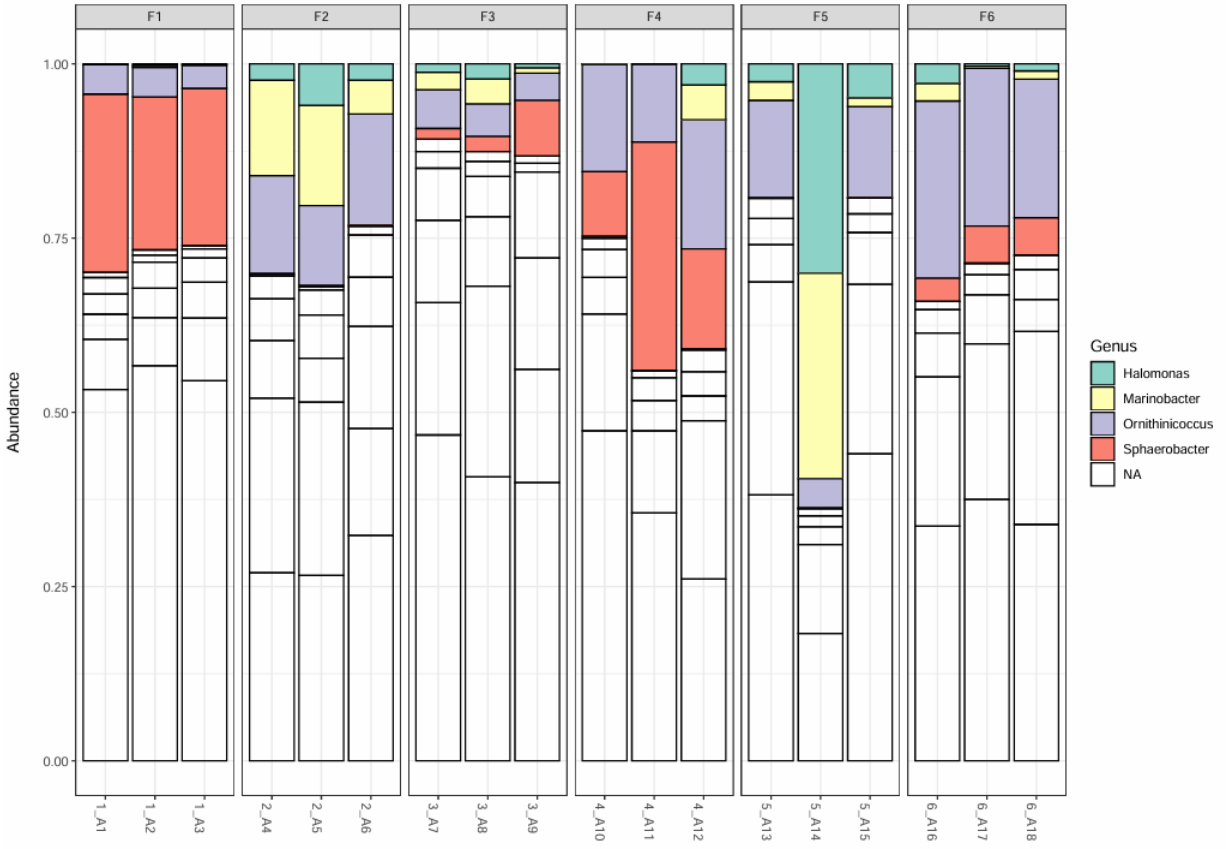


Figura 6 – Gráfico de barras de abundância relativa (%) em nível de gênero considerando as ASVs não atribuídas a nível de gênero.

4.4.3 Grupos bacterianos diferencialmente abundantes entre fazendas

Na avaliação da abundância diferencial, através do DESeq2, ao agrupar as fazendas pelos parâmetros idade da cama, fluxo de CO_2 e nitrogênio total não foi possível observar ASVs estatisticamente significativas entre os grupos. Considerando o fluxo de metano, as fazendas com fluxo médio menor que 500 mg/m^2/dia foram classificadas como baixo fluxo (Fazendas 2, 5 e 6) e as com valores superiores a 2400 mg/m^2/dia foram classificadas como alto fluxo (Fazendas 1, 3 e 4). Foram encontradas 10 ASVs diferencialmente abundantes na comparação entre fazendas com alto e baixo fluxo de metano. Entre os táxons avaliados, observamos que a ASV classificada dentro da ordem Actinomarinales foi a mais abundante nas fazendas com alto fluxo de metano, com valores de abundância variando de 8000 a 2861 *reads*. As ASVs classificadas como da ordem Thermomicrobiales, família Euzebyaceae e gêneros *Ornithinicoccus*, *Nocardioides* (2 ASVs), *Corynebacterium*, *Longispora*, *Ornithinimicrobium* e *Egicoccus* foram mais abundantes nas fazendas com baixo fluxo de metano. A composição taxonômica microbiana associada às ASVs abundantes em cada grupo de fluxo de metano (alto e baixo) nas fazendas, bem como sua abundância, é mostrado na Figura 7.

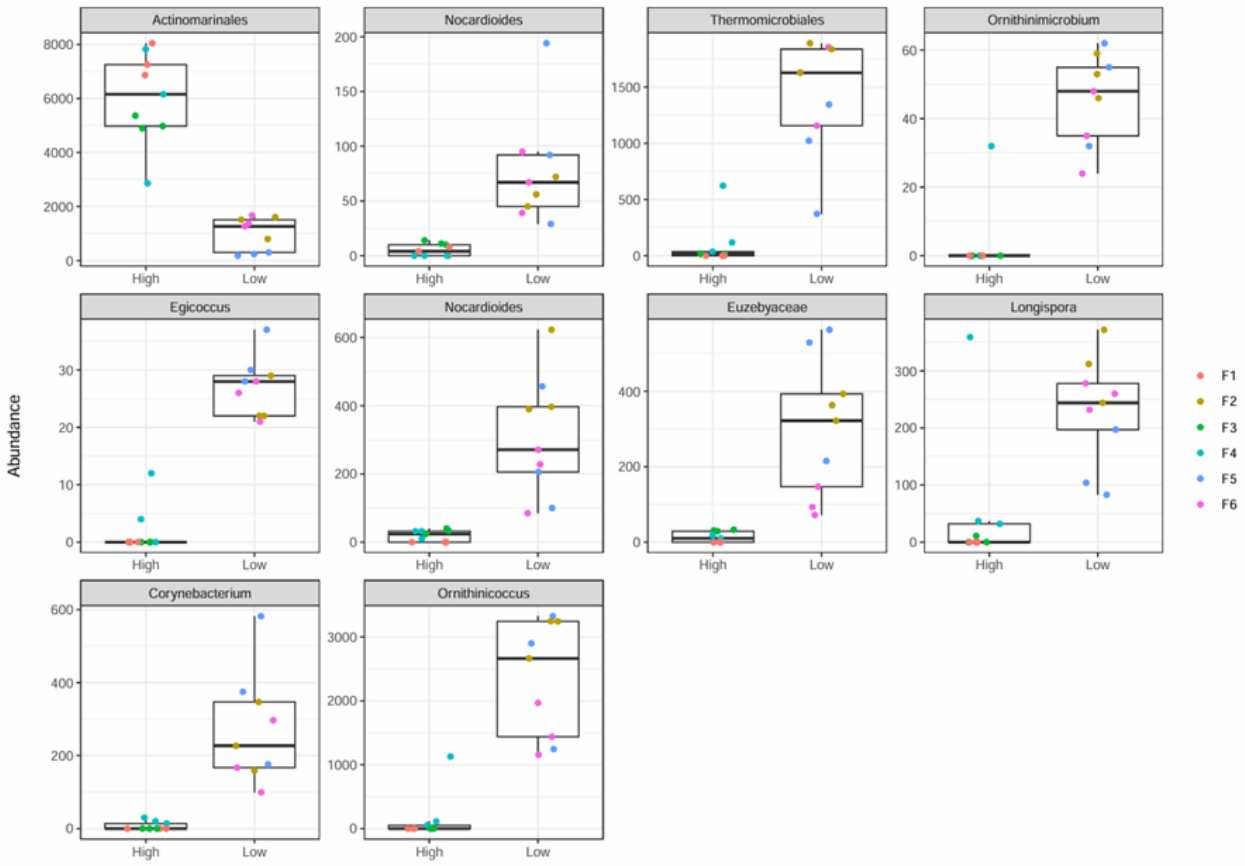


Figura 7 – Abundância diferencial de ASVs entre fazendas com alto e baixo fluxo de metano. Boxplots representam a distribuição da abundância de diferentes táxons microbianos em dois grupos: alto fluxo de metano (High) e baixo fluxo de metano (Low). Cada ponto colorido representa uma fazenda (F1 a F6).

4.5 DISCUSSÃO

O sequenciamento do *amplicon* do gene 16S rRNA representa um avanço metodológico que permite a investigação de microbiomas diversos em uma escala mais fina do que a cultura tradicional. Dada a forte relação entre os microrganismos e os diferentes tipos de ambientes, entender as interações é fundamental para otimizar estratégias sustentáveis, como na produção de gado leiteiro. A humanidade vem enfrentando o crítico desafio em mitigar crescentes emissões de gases de efeito estufa e reduzir os impactos das mudanças climáticas [5,28]. O sistema *compost barn* representa uma estratégia. Sua implementação contribui para a possível redução de emissões de gases de efeito estufa, também relacionadas ao acúmulo de esterco produzido nesses sistemas, tornando-o uma solução ecológica para o setor. O gerenciamento apropriado é necessário para reduzir as emissões relacionadas a esse acúmulo [29]. No entanto, pesquisas sobre a microbiota e a diversidade nos sistemas CB têm sido limitadas. Descrições

detalhadas da microbiota de camas de sistemas CB não estão disponíveis até o momento. Na tentativa de preencher esta lacuna, com uma abordagem metataxonômica, caracterizamos a composição da comunidade microbiana em seis camas de *compost barn* em diferentes fazendas. A utilização do DADA2 para inferir sequências variantes de *amplicon* (ASV), cria um modelo de qualidade que identifica variações nas sequências do gene 16S rRNA, representando um avanço metodológico em nosso estudo.

Os resultados obtidos através da análise de beta-diversidade, bem como os dados taxonômicos, confirmam a hipótese de que há diferença entre a estrutura da microbiota das seis fazendas, evidenciando que cada uma delas é única. Apesar das diferentes localizações das fazendas, todas elas apresentam o clima tropical de altitude, com temperaturas médias semelhantes no período das coletas. Além disso, embora os grupos taxonômicos encontrados a nível de filo, família e gênero terem se assemelhado em algumas fazendas, a extensa diferenciação a níveis de espécie, bem como a abundância e presença de ASVs não classificadas, evidenciam a complexidade e a diversidade ainda não compreendida da microbiota desses ambientes. O percentual de ASVs classificadas como *not assigned* (NA) reflete uma limitação no banco de dados utilizado, além da falta de estudos específicos e conhecimento sobre a microbiota dos sistemas de camas de CB. Esforços precisam ser feitos para acessar de maneira mais eficiente essa microbiota ainda desconhecida. Metodologias como a montagem de genoma a partir de metagenomas, cultivo enriquecido seguido por metagenômica podem ser utilizadas futuramente para o aprofundamento no preenchimento dessa lacuna [30]. Essas ASVs não assinadas podem representar microrganismos com funções ecológicas importantes ainda não identificadas e caracterizadas, destacando a importância de estudos acerca da microbiota na dinâmica das comunidades e na produção de metano.

Quanto à atribuição de filo, Actinobacteriota (anteriormente Actinobacteria) foi predominante em 17 amostras e Proteobacteria em uma amostra (A14). Além disso, Chloroflexi e Firmicutes também estiveram presentes entre os três primeiros filos mais abundantes em grande parte das amostras. Actinobacteriota é um grupo de bactérias gram-positivas que representa, geralmente, o principal grupo bacteriano no estágio termofílico da compostagem. Em altas concentrações, as Actinobacteriota começam a decompor celulose, hemicelulose e lignina [31], ligando o aumento do filo a uma possível correlação com a degradação da matéria orgânica [32]. As camas dos sistemas estudados apresentavam entre 6 e 36 meses de idade, o que contribui para a variação na composição microbiana observada. A idade das camas pode influenciar a abundância de Actinobacteriota, uma vez que a decomposição da matéria orgânica se intensifica com o tempo, refletindo a dinâmica de sucessão ecológica nesse ecossistema. Ren

e colaboradores [33] relataram em estudo utilizando o sequenciamento do gene 16S rRNA, para obter compreensão sobre a dinâmica da população microbiana durante a co-compostagem de esterco de vaca e palha de arroz, que os filos Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes, semelhante ao encontrado em nossos resultados, foram os principais (atualmente Actinobacteria descrito como Actinobacteriota e Bacteroidetes como Bacteroidota). Zhao e colaboradores (2024) [34], em estudo sobre propriedades físico-químicas, gases e mudanças na comunidade microbiana de camas com diferentes materiais (esterco de vaca com serragem, palha e mistura de palha com serragem), encontraram Proteobacteria, Bacteroidota, Actinobacteria, Firmicutes, Chloroflexi e Gemmatimonadota como os seis filos bacterianos dominantes em alguns dos grupos. Além desses, os autores relataram também a presença dos filos Myxococcota e Desulfobacterota entre os 10 mais abundantes, assemelhando-se aos resultados encontrados em nosso estudo, onde 8 dos 10 filos mais abundantes são os mesmos. Firmicutes estão amplamente presentes em vários habitats anaeróbicos naturais e construídos, e são capazes de degradar uma variedade de macromoléculas orgânicas complexas [35]. Foram observados em estudos anteriores como dominantes em digestores anaeróbicos termofílicos e ligados a degradação de matéria orgânica em altas temperaturas [36–38]. Em estudo que visou explorar a dinâmica das comunidades microbianas durante diferentes fases da compostagem através de sequenciamento de *amplicon*, Sun e colaboradores (2020) [29], encontraram que os filos bacterianos predominantes também foram Proteobacteria, Bacteroidetes (atual Bacteroidota), Actinobacteria e Firmicutes, o que corrobora com nossos achados. Diferentes fases da compostagem apresentam diferentes comunidades microbianas, devido a disponibilidade de substâncias orgânicas, que auxiliam no crescimento dos microrganismos.

Quanto a nível de gênero, a maioria das ASVs não foram atribuídas. Os gêneros *Halomonas*, *Marinobacter*, *Ornithinicoccus* e *Sphaerobacter* foram atribuídos a esse nível taxonômico em maior abundância comparado aos demais. Zhao e colaboradores (2024) [34] em estudo mencionado anteriormente, encontraram resultados semelhantes, no qual a maior parte dos gêneros não foram classificados. Além disso, os gêneros *Ornithinicoccus* e *Marinobacter* foram relatados na composição microbiana de todas as amostras do estudo.

As diferenças na abundância de ASVs entre os grupos de fazendas com alto e baixo fluxo de metano, sugerem uma possível correlação entre a composição das comunidades microbianas e o nível de fluxo de metano nas fazendas, indicando que a abundância diferencial de certos táxons pode ser relevante nos processos relacionados ao fluxo de metano. Foi possível observar que as ASVs associadas à ordem Actinomarinales foram predominantemente mais abundantes nas fazendas com alto fluxo de metano (F1, F3 e F4). Actinomarinales é uma ordem

composta por bactérias marinhas epipelágicas com células e genomas altamente simplificados. São encontrados principalmente na zona fótica de oceanos e possuem genoma central altamente conservado [39]. Até o momento, os microrganismos da ordem Actinomarinales não foram amplamente estudados em ambientes terrestres, como os sistemas de compostagem CB, especialmente em relação às emissões de metano. Essa lacuna no conhecimento destaca a importância de investigar a microbiota desses ambientes, de forma a compreender a relação com os impactos ambientais.

Fregulia e colaboradores (2024) [40] encontraram diferenças na composição microbiana de dados 16S rRNA e 18S rRNA para os grupos de alta e baixa produção de metano entérico, porém, não encontraram correlações entre táxons ou funções microbianas e a produção de metano. A ausência de diferenças significativas nos índices de diversidade da microbiota ruminal associada aos grupos de alto e baixo rendimento de metano foi relatada pelos autores. Sugerem, ainda, que o perfil funcional da microbiota ruminal é mais importante para a compreensão da produção de metano entérico do que o perfil taxonômico, já que diferentes táxons podem utilizar substratos semelhantes para produzir produtos finais semelhantes [41]. A hipótese de redundância funcional na microbiota ruminal é reforçada por tais achados, em que diferentes grupos taxonômicos podem desempenhar funções metabólicas semelhantes, utilizando substratos comuns e produzindo produtos finais equivalentes.

O metano entérico de ruminantes é produzido exclusivamente por arqueias metanogênicas durante a fermentação microbiana [42]. Anteriormente, pensava-se que a densidade de arqueias estava diretamente relacionada à produção de metano, no entanto, estudos indicaram que a diversidade de arqueias metanogênicas e suas interações com outros microrganismos no rúmen são influentes na produção de metano [43,44]. Embora as arqueias metanogênicas representem menos de 5% da microbiota ruminal [45], entender a diversidade e as interações é necessário, assim como em estudo do capítulo anterior (Capítulo 2). Em nosso estudo, apenas uma ASV (ASV4946) relacionada a Archaea, classificada como do gênero *Methanobacterium* foi identificada. Isso pode ser atribuído ao fato de que os primers utilizados são mais específicos para bactérias, não amplificando eficientemente o DNA de arqueias.

As ASVs pertencentes à ordem Thermomicrobiales, família Euzebyaceae e aos gêneros *Ornithinicoccus, Nocardioides, Corynebacterium, Longispora, Ornithinimicrobium* e *Egicoccus* foram mais abundantes nas fazendas com baixo fluxo de metano (F2, F5 e F6). O gênero *Ornithinicoccus*, membro da família Instransporangiaceae que esteve presente em todas as amostras do estudo, foi proposto por Groth e colaboradores (1999) [46]. São caracterizadas como bactérias aeróbicas, gram-positivas e apresentam duas espécies classificadas. Em estudos

anteriores, esse gênero foi relatado compondo a comunidade bacteriana durante a compostagem de esterco suíno [47] e a microbiota nasofaríngea, ruminal e vaginal de novilhas de corte [48]. A família Euzebyaceae chamou a atenção em estudo recente [49] devido à intrigante diversidade e abundância em ambientes terrestres, já que até o momento nenhum isolado do gênero *Euzebya* havia sido obtido de nichos terrestres, evidenciando seu papel ainda desconhecido no ciclo geoquímico dos elementos. Song e colaboradores (2021) [50] relataram Euzebyaceae como uma das famílias bacterianas importantes em redes de correlação da estrutura da comunidade bacteriana na compostagem de esterco suíno. *Nocardioides*, *Corynebacterium* e *Ornithinimicrobium* foram encontradas em amostras de esterco sólido e líquido de fazendas leiteiras [51], e em estudos diversos sobre a decomposição de matéria orgânica.

Mudanças na estrutura da comunidade microbiana surgem em resposta às atividades físicas e químicas no processo da compostagem [52–54]. Os resultados deste estudo demonstram que a microbiota das camas de *compost barn* (CB) é única para cada fazenda analisada, evidenciando a complexidade e a diversidade microbiana presente nesses ambientes. A análise metataxonômica revelou que muitas ASVs não foram identificadas, sugerindo a necessidade de mais estudos com microbiomas e a existência de microrganismos com funções ecológicas importantes ainda não caracterizadas. Além disso, observamos que algumas ASVs estiveram presentes nas fazendas com os fluxos de metano, tanto altos quanto baixos, sugerindo que a composição microbiana pode influenciar as emissões de gases de efeito estufa. Este é um importante passo na tentativa de desvendar o desconhecido e melhor compreender a diversidade microbiana ambiental.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Grzymski JJ, Riesenfeld CS, Williams TJ, Dussaq AM, Ducklow H, Erickson M, et al. A metagenomic assessment of winter and summer bacterioplankton from Antarctica Peninsula coastal surface waters. ISME J 2012; 6:1901–15. https://doi.org/10.1038/ismej.2012.31

[2] Behrenfeld MJ, Boss ES. Resurrecting the Ecological Underpinnings of Ocean Plankton Blooms. Annu Rev Mar Sci 2014; 6:167–94. https://doi.org/10.1146/annurev-marine-052913-021325

[3] Tiedje JM, Bruns MA, Casadevall A, Criddle CS, Eloe-Fadrosh E, Karl DM, et al. Microbes and Climate Change: a Research Prospectus for the Future. mBio 2022;13: e00800-22. https://doi.org/10.1128/mbio.00800-22

[4] Silva ALPD, Lélis ADT, Sena WDL, Lima Junior JAD. As contribuições dos microrganismos na qualidade do solo na agricultura. PRW 2024; 6:96–106. https://doi.org/10.53660/PRW-2036-3725

[5] The State of Food Security and Nutrition in the World 2023. FAO; IFAD; UNICEF; WFP; WHO; 2023. https://doi.org/10.4060/cc3017en

[6] Grossi G, Goglio P, Vitali A, Williams AG. Livestock and climate change: impact of livestock on climate and mitigation strategies. Animal Frontiers 2019; 9:69–76. https://doi.org/10.1093/af/vfy034

[7] Beauchemin KA, Ungerfeld EM, Eckard RJ, Wang M. Review: Fifty years of research on rumen methanogenesis: lessons learned and future challenges for mitigation. Animal 2020;14: s2–16. https://doi.org/10.1017/S1751731119003100

[8] Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science 1995; 73:2483–92. https://doi.org/10.2527/1995.7382483x

[9] Ni J-Q, Robarge WP, Xiao C, Heber AJ. Volatile organic compounds at swine facilities: A critical review. Chemosphere 2012; 89:769–88. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.04.061

[10] Zhang Z, Liu D, Qiao Y, Li S, Chen Y, Hu C. Mitigation of carbon and nitrogen losses during pig manure composting: A meta-analysis. Science of The Total … 2021.

[11] Hansen CL, Cheong DY. Agricultural Waste Management in Food Processing. Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery Engineering, Elsevier; 2019, p. 673–716. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814803-7.00026-9

[12] Weinberg Z, Chen Y, Khanal P, Pinto R, Zakin V, Sela S. The effect of cattle manure cultivation on moisture content and survival of Escherichia coli12. Journal of Animal Science 2011; 89:874–81. https://doi.org/10.2527/jas.2010-3272

[13] Fávero S, Portilho FVR, Oliveira ACR, Langoni H, Pantoja JCF. Factors associated with mastitis epidemiologic indexes, animal hygiene, and bulk milk bacterial concentrations in dairy herds housed on compost bedding. Livestock Science 2015; 181:220–30. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.09.002

[14] Eckelkamp EA, Taraba JL, Akers KA, Harmon RJ, Bewley JM. Understanding compost bedded pack barns: Interactions among environmental factors, bedding characteristics, and udder health. Livestock Science 2016; 190:35–42. https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.05.017

[15] Sun J, Qian X, Gu J, Wang X, Gao H. Effects of oxytetracycline on the abundance and community structure of nitrogen-fixing bacteria during cattle manure composting. Bioresource Technology 2016; 216:801–7. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.060

[16] Tiquia SM. Microbial Community Dynamics in Manure Composts Based on 16S and 18S rDNA T-RFLP Profiles. Environmental Technology 2005; 26:1101–14. https://doi.org/10.1080/09593332608618482

[17] Yamamoto N, Asano R, Yoshii H, Otawa K, Nakai Y. Archaeal community dynamics and detection of ammonia-oxidizing archaea during composting of cattle manure using culture-independent DNA analysis. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 90:1501–10. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3153-2

[18] Mishra S, Singh SN, Pande V. Bacteria induced degradation of fluoranthene in minimal salt medium mediated by catabolic enzymes in vitro condition. Bioresource Technology 2014;164:299–308. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.076

[19] Leso L, Barbari M, Lopes MA, Damasceno FA, Galama P, Taraba JL, et al. Invited review: Compost-bedded pack barns for dairy cows. Journal of Dairy Science 2020; 103:1072–99. https://doi.org/10.3168/jds.2019-16864

[20] Myer PR, Wells JE, Smith TPL, Kuehn LA, Freetly HC. Microbial community profiles of the colon from steers differing in feed efficiency. SpringerPlus 2015; 4:454. https://doi.org/10.1186/s40064-015-1201-6

[21] Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Research 2013;41:e1–e1. https://doi.org/10.1093/nar/gks808

[22] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat Methods 2016; 13:581–3. https://doi.org/10.1038/nmeth.3869

[23] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Research 2012;41: D590–6. https://doi.org/10.1093/nar/gks1219

[24] R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2019

[25] McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. PLoS ONE 2013; 8: e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

[26] Wickham H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York, NY: Springer New York; 2009. https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3

[27] Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol 2014; 15:550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

[28] Alexandratos N, Bruinsma J. World agriculture towards 2030/2050: the 2012revision. Rome: 2012.

[29] Sun L, Han X, Li J, Zhao Z, Liu Y, Xi Q, et al. Microbial Community and Its Association With Physicochemical Factors During Compost Bedding for Dairy Cows. Front Microbiol 2020; 11:254. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00254

[30] Setubal JC. Metagenome-assembled genomes: concepts, analogies, and challenges. Biophys Rev 2021; 13:905–9. https://doi.org/10.1007/s12551-021-00865-y

[31] Steger K, Sjögren ÅM, Jarvis Å, Jansson JK, Sundh I. Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste. J Appl Microbiol 2007; 103:487–98. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03271.x

[32] Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, et al. Genomics of Actinobacteria: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. Microbiol Mol Biol Rev 2007; 71:495–548. https://doi.org/10.1128/MMBR.00005-07

[33] Ren G, Xu X, Qu J, Zhu L, Wang T. Evaluation of microbial population dynamics in the co-composting of cow manure and rice straw using high throughput sequencing analysis. World J Microbiol Biotechnol 2016; 32:101. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2059-7

[34] Zhao C, Wu B, Hao W, Li G, Yan P, Yang X, et al. Dynamic Changes in Physicochemical Properties and Microbial Community in Three Types of Recycled Manure Solids for Dairy Heifers. Agronomy 2024; 14:1132. https://doi.org/10.3390/agronomy14061132

[35] Weiss A, Jérôme V, Freitag R, Mayer HK. Diversity of the resident microbiota in a thermophilic municipal biogas plant. Appl Microbiol Biotechnol 2008; 81:163–73. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1717-6

[36] Tang Y-Q, Matsui T, Morimura S, Wu X-L, Kida K. Effect of temperature on microbial community of a glucose-degrading methanogenic consortium under hyperthermophilic chemostat cultivation. Journal of Bioscience and Bioengineering 2008; 106:180–7. https://doi.org/10.1263/jbb.106.180

[37] Tang Y-Q, Ji P, Hayashi J, Koike Y, Wu X-L, Kida K. Characteristic microbial community of a dry thermophilic methanogenic digester: its long-term stability and change with feeding. Appl Microbiol Biotechnol 2011; 91:1447–61. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3479-9

[38] Goberna M, Insam H, Franke-Whittle IH. Effect of Biowaste Sludge Maturation on the Diversity of Thermophilic Bacteria and Archaea in an Anaerobic Reactor. Appl Environ Microbiol 2009; 75:2566–72. https://doi.org/10.1128/AEM.02260-08

[39] López-Pérez M, Haro-Moreno JM, Iranzo J, Rodriguez-Valera F. Genomes of the "Candidatus Actinomarinales" Order: Highly Streamlined Marine Epipelagic Actinobacteria. mSystems 2020;5: e01041-20. https://doi.org/10.1128/mSystems.01041-20

[40] Fregulia P, Dias RJP, Campos MM, Tomich TR, Pereira LGR, Neves ALA. Composition of the rumen microbiome and its association with methane yield in dairy cattle raised in tropical conditions. Mol Biol Rep 2024; 51:447. https://doi.org/10.1007/s11033-024-09381-0

[41] Li F, Li C, Chen Y, Liu J, Zhang C, Irving B, et al. Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. Microbiome 2019; 7:92. https://doi.org/10.1186/s40168-019-0699-1

[42] Boone DR, Whitman WB, Rouvière P. Diversity and Taxonomy of Methanogens. In: Ferry JG, editor. Methanogenesis, Boston, MA: Springer US; 1993, p. 35–80. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2391-8_2

[43] Wallace RJ, Rooke JA, Duthie C-A, Hyslop JJ, Ross DW, McKain N, et al. Archaeal abundance in post-mortem ruminal digesta may help predict methane emissions from beef cattle. Sci Rep 2014; 4:5892. https://doi.org/10.1038/srep05892

[44] Pitta DW, Melgar A, Hristov AN, Indugu N, Narayan KS, Pappalardo C, et al. Temporal changes in total and metabolically active ruminal methanogens in dairy cows supplemented with 3-nitrooxypropanol. Journal of Dairy Science 2021; 104:8721–35. https://doi.org/10.3168/jds.2020-19862

[45] Pitta D, Indugu N, Narayan K, Hennessy M. Symposium review: Understanding the role of the rumen microbiome in enteric methane mitigation and productivity in dairy cows. Journal of Dairy Science 2022; 105:8569–85. https://doi.org/10.3168/jds.2021-21466

[46] Groth I, Schumann P, Martin K, Schuetze B, Augsten K, Kramer I, et al. Ornithinicoccus hortensis gen. nov., sp. nov., a soil actinomycete which contains L-ornithine. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 1999; 49:1717–24. https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1717

[47] Zhao W, Gu J, Wang X, Hu T, Wang J, Yu J, et al. Effects of shrimp shell powder on antibiotic resistance genes and the bacterial community during swine manure composting. Science of The Total Environment 2021; 752:142162. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142162

[48] Amat S, Holman DB, Schmidt K, Menezes ACB, Baumgaertner F, Winders T, et al. The Nasopharyngeal, Ruminal, and Vaginal Microbiota and the Core Taxa Shared across These Microbiomes in Virgin Yearling Heifers Exposed to Divergent In Utero Nutrition during Their First Trimester of Gestation and in Pregnant Beef Heifers in Response to Mineral Supplementation. Microorganisms 2021; 9: 2011. https://doi.org/10.3390/microorganisms9102011

[49] Gonzalez-Pimentel JL, Martin-Pozas T, Jurado V, Laiz L, Fernandez-Cortes A, Sanchez-Moral S, et al. The Marine Bacterial Genus Euzebya Is Distributed Worldwide in Terrestrial Environments: A Review. Applied Sciences 2023; 13:9644. https://doi.org/10.3390/app13179644

[50] Song T, Zhu C, Li B, Jiang K, Wang X, Sardar MF, et al. Ciprofloxacin Causes the Greatest Bacterial Community Variation in Swine Manure Composting. Front Environ Sci 2021; 9:786592. https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.786592

[51] Pandey P, Chiu C, Miao M, Wang Y, Settles M, Del Rio NS, et al. 16S rRNA analysis of diversity of manure microbial community in dairy farm environment. PLoS ONE 2018;13: e0190126. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190126

[52] Duan Y, Awasthi SK, Chen H, Liu T, Zhang Z, Zhang L, et al. Evaluating the impact of bamboo biochar on the fungal community succession during chicken manure composting. Bioresource Technology 2019; 272:308–14. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.10.045

[53] Gurmessa B, Ashworth AJ, Yang Y, Savin M, Moore PA, Ricke SC, et al. Variations in bacterial community structure and antimicrobial resistance gene abundance in cattle manure and poultry litter. Environmental Research 2021; 197:111011. https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111011

[54] Wan J, Wang X, Yang T, Wei Z, Banerjee S, Friman V-P, et al. Livestock Manure Type Affects Microbial Community Composition and Assembly During Composting. Front Microbiol 2021; 12: 621126. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.621126