

T300

V699 &

2005



Fabiana Santos Vilela

**TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE SUINOCULTURA EM
REATORES ANAERÓBIOS DE BATELADA: EFICIÊNCIA DE
FERMENTAÇÃO E DIVERSIDADE MICROBIANA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva,

Orientador: Prof. Israel José da Silva
Co-orientador: Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Belo Horizonte
Escola de Veterinária da UFMG
2005

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
DA UFMG
08/08/05
1317205-11

374098

V699t Vilela, Fabiana Santos, 1972-

Tratamento de águas residuais de suinocultura em reatores anaeróbicos de batelada: eficiência de fermentação e diversidade microbiana / Fabiana Santos Vilela. – 2005.

69 p. :il.

Orientador: Israel José da Silva

Co-orientador: Ivanildo Evódio Marriel


Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Águas residuais – Tratamento biológico – Teses. 2. Saneamento ambiental – Teses. I. Silva, Israel José da. II. Marriel, Ivanildo Evódio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 628.162

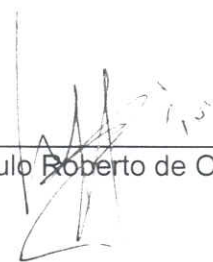
Dissertação defendida e aprovada em 20 de maio de 2005, pela Comissão Examinadora constituída por:


Prof. Israel José da Silva
(orientador)


Prof. Antônio Fernandino de Castro Bahia Filho


Prof. Antônio Teixeira Matos


Dr. Ivanildo Evódio Marriet


Prof. Paulo Roberto de Oliveira

Minha mãe achava estudo a coisa mais fina do mundo.
Não é.
A coisa mais fina do mundo é o sentimento.
Aquele dia de noite, o pai fazendo serão, ela falou comigo:
“Coitado, até essa hora fazendo serviço pesado.”
Rrumou pão e café, deixou tacho no fogo com água quente.
Não me falou em amor.
Essa palavra era de luxo.

(Adélia Prado)

DEDICATÓRIA

*“À minha mãe, Hildaga, com muito amor e uma
saudade imensa!
“Quando não estás aqui, meu espírito se perde,
voa longe, longe...”
(Renato Russo)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde durante todo o período do Mestrado para que eu pudesse concluir esse sonho;

A minha Mãe que com sacrifício de sua vida, me deu a minha vida, e me ensinou a ser tudo que sou hoje;

A meu Pai, pelo apoio, auxílio, pelo *“Paitrocínio”* em diversos apuros, às inúmeras correções desse trabalho, e seu esforço por nossa educação, sempre de qualidade;

A meus irmãos, Mário Luís e Pierre, pela nossa amizade, pelo carinho de vocês, pelo apoio e auxílio durante a realização não só desse trabalho, mas em tudo. *“Um por todos e todos por um”*;

A minha avó, Maria da Conceição Simonini, pelo seu amor e carinho;

A minha Princesinha, Mariana, pela nossa doce convivência, nosso maior presente;

A minha tia Dalma, por conseguir tornar possível o impossível;

A meu primo e colega (com muito orgulho), Marcus Gustavo (Fofó), pelo auxílio na árdua tarefa de coletar os efluentes, correndo de búfalos e carregando galões e galões de efluentes. Pela formatação interminável desse trabalho!

A meu padrinho, Tio Marco, por ter me dirigido à área de meio ambiente;

A meu orientador, Prof. Israel, pela oportunidade de realizar esse sonho;

A meu co-orientador, Dr. Ivanildo, pelos ensinamentos, pelo auxílio na execução do trabalho e concretização deste;

A Tom Bahia, por ter possibilitado a realização desse experimento no CNPMS/EMBRAPA;

À UFMG, pela oportunidade;

À EMBRAPA/CNPMS, por ter me acolhido e possibilitado a realização dessa pesquisa em suas instalações e à Luciene, Eliane, Rui, Mírian, Christiane e todos outros pesquisadores e

funcionários do CNPMS, que direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho;

A suinocultor, José Américo, que possibilitou as nossas idas à sua granja e coleta do afluente, compreendendo a importância da pesquisa no desenvolvimento sustentável da suinocultura brasileira;

A Prof. Keller, DESA/UFMG, por me ter acolhido e possibilitado a realização das análises físico-químicas dos efluentes e qualitativa do biogás na Escola de Engenharia e à Lucileine e Norma, técnicas deste laboratório, pelas análises laboratoriais realizadas por vocês;

Aos meus "amigos do peito", Ana Amélia, Ana Paula, Raquelzinha, Vânius, Coelho, Ana Luísa, José Flávio, Antônio, Suely, Rosely, Edna, Márcia por nossa infinita amizade;

Aos meus familiares, cunhadas, tios, tias, primos, primas, "agregados" e ao novo integrante da "trupe", Luiz Felipe, por nossa amizade e união.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Características das águas residuárias da suinocultura.....	14
2.2 Rebanho, produção anual de carne e de efluentes suínos em Minas Gerais	15
2.3 Reatores anaeróbios	15
2.4 Fundamentos da digestão anaeróbia.....	17
2.5 Fatores que interferem na digestão anaeróbia	19
2.6 Partida e operação de reatores anaeróbios	21
2.7 As <i>Archaea</i>	22
2.8 Bioquímica da digestão anaeróbia	23
2.9 Formação do metano	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Caracterização dos reatores utilizados	25
3.2 Definição do experimento.....	27
3.3 Análises físicas, químicas e bioquímicas	29
3.4 Análise quantitativa do biogás.....	29
3.5 Análise qualitativa do biogás	33
3.6 Avaliação quantitativa da população bacteriana	33
3.7 Identificação de <i>Archaea</i>	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Análises físicas, químicas e bioquímicas	35
4.4 Análise qualitativa dos gases	39
4.4 Análise quantitativa dos gases	43
4.5 Análise da contagem da população microbiana em dejetos de suíno.....	49
4.6 Diversidade genética da população de bactérias e de <i>Archaea</i> por meio de eletroforese em gel de gradiente (DGGE).....	55
5 CONCLUSÕES	62
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	63
7 ANEXOS	67

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de N, P, K em dejetos de suínos.....	15
Tabela 2 : Resultados da análise física, química e biológica – Primeiro ciclo do experimento. .	36
Tabela 3 : Resultados das análises físicas, químicas e biológicas – Segundo ciclo do experimento.....	38
Tabela 4: Resultados das coletas realizadas nos reatores em funcionamento (1, 2 e 3), no segundo ciclo.	39
Tabela 5: Análise quantitativa da produção de gases no primeiro ciclo do experimento.....	43
Tabela 6: Análise quantitativa dos gases no segundo ciclo do experimento	47
Tabela 7: População e bactérias presentes nos efluentes dos reatores no segundo ciclo do experimento.....	49
Tabela 8: Matriz da percentagem de distâncias entre os microrganismos analisados a partir do DGGE de <i>Archaea</i> . A partir dessa tabela foi elaborado o gráfico inserido no trabalho.	69

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Foto do tanque-decantador, local de coleta do efluente bruto.	25
Figura 2: Foto dos reatores construídos para o desenvolvimento da pesquisa.	27
Figura 3: Foto dos gasômetros construídos em garrafas pet.	31
Figura 4: Foto do medidor de fluxo.	31
Figura 5: Resultados das coletas de gases realizadas nos reatores em funcionamento (1,2,3), durante o segundo ciclo do experimento.	41
Figura 6: Análise quantitativa da produção de gases no primeiro ciclo do experimento.	45
Figura 7: Análise quantitativa dos gases no segundo ciclo do experimento.	49
Figura 8: Foto da amostra retirada do afluente, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-3}	51
Figura 9: Foto da amostra composta dos efluentes dos reatores 1, 2 e 3, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-3}	53
Figura 10: Foto da amostra composta dos efluentes dos reatores 4, 5 e 6, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-3}	53
Figura 11: Foto da amostra composta do efluente dos reatores 7, 8 e 9, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-4}	55
Figura 12: Foto do DGGE de bactérias com os primers R1401 x F968GC universais para bactérias.	57
Figura 13: Foto do DGGE com os primers específicos de <i>Archaea</i>	59
Figura 14: Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de <i>Archaea</i> de efluentes de suinocultura, detectadas por DGGE.	61
Figura 15: Gel de agarose a 1% para ver a qualidade do DNA de bactéria, após PCR.	67
Figura 16: Gel de agarose a 1,5% amostras de DNA diluídas a 30 vezes e amplificadas com primers de bactérias R1401 e F968GC.	67
Figura 17: Gel de agarose a 1,5%, DNA amplificado com primers R1401 x F968GC e segunda amplificação com primers AR4F x UNI 1492.	69

RESUMO

Devido às vantagens oferecidas pelo processo de digestão anaeróbia em tratamento de efluentes líquidos, sobretudo pelo baixo volume de lodo gerado, quando comparado ao tratamento aeróbio, vários autores dirigem seus estudos com o propósito de dominá-lo. Porém, trata-se de um processo complexo de degradação e susceptível às variações de condições ambientais, como pH, temperatura, concentração de substratos e de produtos tóxicos, que podem comprometer a eficiência do processo. No presente trabalho buscou-se avaliar a eficiência dos reatores anaeróbios de batelada no tratamento de águas residuárias de suinocultura, com a utilização de diferentes inoculantes, avaliando a diversidade microbiana responsável pela degradação da matéria orgânica presente nesses efluentes. Para isso, foi feito o isolamento e a caracterização de *Archaea* metanogênicas, microrganismos, esses, responsáveis pela fase final do processo de degradação da matéria orgânica existente no efluente e, conseqüentemente, pela produção de biogás, possibilitando, inclusive, a utilização deste na produção de energia. Para identificação desses microrganismos foram utilizadas as técnicas de PCR e DGGE. A eficiência do reator anaeróbio foi considerada mediana, não atendendo aos requisitos da legislação ambiental, se for utilizado isoladamente. A biodiversidade microbiana variou em número de espécies quando comparado o afluente do efluente tratado, demonstrando uma rica diversidade microbiana que é responsável pela degradação da matéria orgânica.

Palavras-Chave: Efluente, suinocultura, gás metano, identificação, microbiota, *Archaea*.

ABSTRACT

Due to the advantages offered by the process of anaerobic digestion in the treatment of liquid effluents, mainly for the small sludge volume produced if compared to the aerobic treatment, several authors address their studies with the objective of controlling it. However, this is a complex process of degradation and it is susceptible to environmental variations, such as pH, temperature, substrate concentration, and toxic products, which may affect the efficiency of the process. The aim of the present paper was to evaluate the efficiency of sequencing batch of anaerobic reactors in the treatment of swine wastewater, with the utilization of different inoculations making the evaluation of the microbial diversity responsible for the organic material degradation present in these effluents. For this reason, it was made the isolation and identification of the methanogenic *Archaea*, microorganisms that are responsible for the final phase of the organic material degradation process that occurs in the effluent, and, consequently, for the methane gas production, making feasible its utilization in the production of energy. To identify these microorganisms, techniques such as PCR and DGGE were utilized. The anaerobic reactor's efficiency was considered inside the average, not attending the requirements of the environmental legislation, if used in isolation. The microbial biodiversity varies in number of specimen when the affluent is compared to the treated effluent, demonstrating a rich microbial diversity responsible for the organic material degradation.

key words: effluent, swine breeding, methane gas, isolation, PCR, *Archaea*

1 INTRODUÇÃO

Até há pouco tempo, imperava uma clara e generalizada despreocupação com os recursos hídricos, tanto no seu componente quantitativo, quanto qualitativo, apesar da observância crescente de conflito entre usos alternativos da água, inclusive em várias partes do território brasileiro. Entre outras ocorrências, o descarte e conseqüente disposição de esgotamentos sanitários e efluentes agroindustriais nos corpos d'água superficiais, sem nenhum tratamento, aliados à disposição não apropriada dos resíduos sólidos urbanos e industriais, decorrentes da industrialização e urbanização acelerada, têm causado problemas ambientais crescentes, principalmente por comprometer a qualidade das águas, superficiais e subterrâneas.

No setor agrícola, a suinocultura constitui-se em uma atividade pecuária geradora de dejetos com elevada carga orgânica. Além disso, está, na maioria das vezes, concentrada em pólos e suas águas residuárias são lançadas, via de regra, em corpos d'água superficiais, podendo, desse modo, ocasionar problemas pontuais de poluição dessas águas. Por isso, ela é classificada, no Conselho Estadual de Política Ambiental (COPAM) do estado de Minas Gerais, como atividade de grande potencial poluidor e, como tal, crescentemente controlada em todo os países produtores de carne suína, inclusive no Brasil.

No caso brasileiro, os dejetos suínos, até a década de 70, não constituíam um problema significativo, pois a concentração de animais era pequena, podendo ser utilizados como adubo orgânico pelos criadores. Em criações de maior porte, são produzidas grandes quantidades de dejetos, que demandam grandes áreas para sua disposição. Entretanto, com a expansão da suinocultura, esses dejetos são também lançados diretamente nos corpos d'água superficiais, na maioria das vezes sem qualquer critério ou tratamento prévio, transformando-se, na atualidade, na maior fonte poluidora dos mananciais de água por

resíduos originários da atividade agropecuária.

O tratamento dos dejetos gerados pela suinocultura é tão importante quanto a própria criação dos animais, e deve ser analisado sob vários enfoques:

- ✓ Finalidade conservacionista: eliminar ou amenizar a elevada concentração de dejetos gerados nas propriedades, de modo a reduzir ou eliminar seu potencial poluidor;
- ✓ Finalidade agrônômica: utilizar os dejetos como fertilizante orgânico, disponível nas propriedades, complementando a adubação mineral e melhorando as condições físicas do solo, aumentando, assim, a produtividade de lavouras e pastagens;
- ✓ Finalidade sanitária: reduzir o potencial de transmissão de agentes causais de doenças, melhorando a produtividade dos rebanhos de suínos. Aliado a esse fato, o tratamento dos dejetos evita o lançamento de patógenos (ovos de helmintos e bactérias, como as *Salmonella* sp.) nos cursos d'água, prevenindo a contaminação de populações, a jusante das granjas;
- ✓ Finalidade social: solucionar o problema de concentração elevada de dejetos, contribuindo para manutenção dessa importante atividade pecuária, com isso viabilizando a continuidade do processo agroindustrial, o que contribui, ademais, para a fixação do homem no campo.

O sistema de tratamento de efluentes de suinocultura mais utilizado em Minas Gerais, atualmente, é o sistema Australiano, à semelhança do tratamento de esgotos urbanos, que nada mais é que um sistema de lagoas de estabilização, dispostas em série.

Esse sistema apresenta algumas desvantagens, quais sejam: (i) sendo a carga orgânica dos dejetos de suínos muito elevada, é lento o processo biológico de degradação dessa matéria orgânica; por isso, o processo demanda longos tempos de detenção hidráulica, para que as reações se completem, o que implica na

necessidade de grandes áreas; (ii) custo das lagoas de estabilização, em regiões onde o valor da terra é maior ou onde as condições topográficas desfavoráveis resultam em maior movimentação de terra para sua implantação e, finalmente, (iii) a possibilidade de emanção de odores desagradáveis.

Assim, os reatores anaeróbios podem constituir-se numa alternativa de tratamento para aqueles suinocultores que não possuem área suficiente, em suas propriedades, para implantação de um sistema de tratamento de efluentes constituído por lagoas de estabilização e, também, para os produtores instalados em regiões em que o valor da terra ou topografia desfavorável tornem por demais onerosa a implantação desse tipo de sistema de tratamento.

Além dessas vantagens, os reatores anaeróbios possibilitam ao criador de suínos a utilização do biogás produzido, a partir da degradação da matéria orgânica, para geração de energia elétrica para uso na própria granja, reduzindo custos de produção e evitando, ademais, a liberação de gases poluentes (gás metano e gás carbônico) para a atmosfera.

Dentro desse contexto, os objetivos desse trabalho foram:

- ✓ avaliar a eficiência de fermentação de reatores anaeróbios de batelada para tratamento de águas residuárias de suinocultura;
- ✓ avaliar a diversidade microbiana, na fase anaeróbia do processo, responsável pela degradação da matéria orgânica presente nos dejetos de suínos assim tratados;
- ✓ avaliar a adição de diferentes inóculos na eficiência do reator;
- ✓ identificar os microrganismos metanogênicos presentes nos efluentes (*Archaea* metanogênicas), existentes nesse efluente, cuja principal função seria a finalização do processo de degradação da matéria orgânica e, conseqüentemente, pela produção do biogás (gás carbônico e metano);

- ✓ Avaliar a produção de gás metano, visando seu aproveitamento para fins energéticos – produção de energia limpa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo, faz-se revisão da literatura relacionada ao tratamento de águas residuárias de suinocultura pelo processo anaeróbio. Inicia-se enfocando os efluentes líquidos, apresentando suas características, formas de geração e conseqüência de seu lançamento em corpos receptores (abordando, inclusive, os aspectos legais), que implicam na necessidade de seu tratamento. O processo anaeróbio é descrito em relação a sua microbiologia, às condições ambientais requeridas e às reações envolvidas. A aplicação do processo anaeróbio para tratamento de efluentes provenientes de granjas de suínos é relatada, ao final, como uma alternativa tecnológica viável, examinando-se suas vantagens e desvantagens, a retenção de biomassa, os parâmetros de monitoramento e detalhes técnicos/construtivos dos reatores anaeróbios.

Entende-se por poluição das águas a adição de substâncias ou de formas de energia que, direta ou indiretamente, alterem a natureza do corpo d'água, de uma maneira tal que prejudique os legítimos usos que dele são feitos. (Chernicharo, 1997)

Segundo este autor, a introdução de matéria orgânica em um corpo d'água resulta, indiretamente, no consumo de oxigênio dissolvido. Tal se deve aos processos de estabilização da matéria orgânica, realizados pelas bactérias decompositoras, as quais utilizam o oxigênio disponível no meio líquido para sua respiração. O decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido tem diversas implicações do ponto de vista ambiental, constituindo-se num dos maiores problemas de poluição das águas em nosso país.

Considerando esse impacto negativo direto sobre a qualidade das águas brasileiras, o CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente -, por meio da Resolução nº 357,

de 17 de março de 2005, redefiniu os parâmetros de lançamento de diversas substâncias nos corpos hídricos, tanto minerais, quanto substâncias químicas (agrotóxicos, etc.). Com a mesma preocupação, a legislação ambiental estadual também estabeleceu padrões rigorosos, relativos à quantidade de substâncias permissível de lançamento nos corpos d'água receptores, de domínio do Estado, COPAM 010/86. Diante da necessidade decorrente de se tratarem os efluentes, antes de seu lançamento em corpos d'água, diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas, buscando a melhoria da eficiência na remoção dessas substâncias, ao menor custo possível.

2.1 Características das águas residuárias da suinocultura

A água residuária, oriunda da criação de suínos confinados, compõe-se de fezes, urina, resíduo de ração, excesso de água dos bebedouros e de água de higienização (Konzen, 1997).

Uma granja suinícola produz, em média, 8,6 litros de efluentes líquidos e 160g de DBO por animal/dia. Se esses efluentes fossem lançados diretamente, sem tratamento prévio, em cursos d'água, o impacto ambiental negativo assumiria grande magnitude, considerando que as águas residuárias dessas granjas apresentam potencial poluidor muitas vezes maior que o de esgoto urbano (Oliveira, 1993).

Segundo Penz Jr. (1996), estima-se que somente 35% a 45% do N protéico consumido pelas aves e suínos é transformado em produto animal (carne), evidenciando, assim, a ineficiência desses animais em transformar os nutrientes em proteína de alta qualidade.

Dessa forma, a preocupação atual, em relação a custo da alimentação e ao meio ambiente, tem levado os nutricionistas a buscarem alternativas, no sentido de manipular nutricionalmente a dieta, com base nos conhecimentos da digestibilidade dos nutrientes contidos nos alimentos, principalmente quanto ao aproveitamento

dos nutrientes da dieta e maximização do potencial produtivo dos animais, reduzindo, a um só tempo, custo de produção e o impacto ambiental negativo dos resíduos por excreções indesejáveis.

Os aminoácidos dietéticos exigidos pelos suínos são destinados à síntese de proteína corporal ou à manutenção dos tecidos. A parte indigestível da proteína dietética é excretada nas fezes. Entretanto, a maior proporção do nitrogênio excretado aparece na urina, resultante da desaminação do excesso de aminoácidos absorvidos. Os suínos em peso de abate podem excretar, nas fezes, aproximadamente, 9 a 18% do N consumido e na urina, 42 a 48%. O N urinário encontra-se na forma de uréia, que é rapidamente transformada em NH_3 e volatilizada, enquanto o N das fezes é mais resistente à degradação. (Fialho et al. 2003).

O desperdício de água, que se observa no manejo da maioria das granjas de produção, é um dos maiores complicadores para o tratamento de dejetos de suínos, pois aumenta demasiadamente o volume de efluentes a serem tratados, apesar de que, em contra-partida diminuiria a carga orgânica presente no mesmo. As águas utilizadas no manejo, somadas às desperdiçadas pelos animais e por deficiências nas instalações e as infiltradas nas unidades de produção, canalização e armazenamento, além da urina e fezes dos animais, produzem um material predominantemente líquido, com cerca de 96% de água e 4% de sólidos em suspensão (Bley Júnior, 1997).

A composição do liquame está associada ao sistema de manejo adotado e, principalmente, à quantidade de urina e água que o acompanham, o tipo de alimentação e à idade dos animais, podendo apresentar grande variação em seus componentes (Oliveira, 1994, citado por Ferreira e Silva, 1997). Esses dejetos líquidos apresentam alto valor composicional, pois em torno de 35% dos componentes das dietas são convertidos em peso corporal, enquanto que 65% são excretados (Konzen, 1997).

A remoção dos poluentes pelo tratamento, de forma a adequar o lançamento a uma quantidade desejada ou ao padrão de qualidade exigido pela legislação ambiental, está associada aos conceitos de nível de tratamento e eficiência do mesmo. O tratamento preliminar objetiva a remoção dos sólidos grosseiros, enquanto o tratamento primário visa a remoção de sólidos sedimentáveis e parte da matéria orgânica. Em ambos, predominam os mecanismos físicos de remoção de poluentes. Já no tratamento secundário, no qual predominam mecanismos biológicos, o objetivo é, principalmente, a remoção de matéria orgânica e, eventualmente,

nutrientes (nitrogênio e fósforo). O tratamento terciário objetiva a remoção de poluentes específicos (usualmente tóxicos ou compostos não biodegradáveis), ou ainda, a remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário. A quantidade desses componentes no efluente pode variar muito, conforme já citado.

A quantidade de nutrientes presente nos dejetos, dos três elementos principais, determinantes para o aproveitamento desses dejetos na adubação de plantas - o nitrogênio (N), o fósforo (P) e o potássio (K) - é apresentada na tabela 1.

Tabela 1: Concentração de N, P, K em dejetos de suínos.

Parâmetro	Dejetos líquidos	Dejetos sólidos
Nitrogênio	3,18 kg/m ³	11,60 kg/m ³
Fósforo	5,40 kg/m ³	9,30 kg/m ³
Potássio	1,38 kg/m ³	7,80 kg/m ³

Fonte: Oliveira (1994).

2.2 Rebanho, produção anual de carne e de efluentes suínos em Minas Gerais

Segundo dados recentes da Secretaria de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do estado de Minas Gerais (SEAPA – MG, 2004), o Estado detém, atualmente, o quarto rebanho suíno do País e é considerado, inclusive, um dos principais centros de melhoramento genético de suínos do Brasil. Minas Gerais conta, atualmente, segundo esses dados da Secretaria, com 1777 granjas tecnificadas, com mais de 162 mil matrizes alojadas, portanto, uma média de 91 matrizes por granja. Considerando a produtividade média por matriz de 1860 quilos por ano, a produção média anual de carne é superior a 301 mil toneladas no Estado. Baseando-se nesse número de matrizes alojadas, e uma produção média de 20 animais cevados por matriz e por ano e a produção média diária de efluente, de 8,6 litros/animal/dia, são gerados diariamente 278,64 milhões de litros de efluente de suinocultura, apenas na fase de terminação das granjas tecnificadas do Estado de Minas Gerais.

2.3 Reatores anaeróbios

Em princípio, todos os compostos orgânicos podem ser degradados via anaeróbia, mas o processo mostra-se mais eficiente e mais econômico quando esses compostos são facilmente biodegradáveis. Segundo Chernicharo (1997), as diversas características favoráveis dos sistemas anaeróbios, passíveis de serem operados com elevados tempos de retenção de sólidos e baixos tempos de detenção hidráulica (tempo em que o efluente fica retido no reator para que haja a degradação da matéria orgânica), conferem aos reatores anaeróbios grande potencial de aplicação em tratamentos de águas residuárias.

Nos sistemas anaeróbios, a maior parte do material orgânico biodegradável, presente no despejo, é convertida em biogás (cerca de 70 a 90%), que é removido da fase líquida e deixa o reator na fase gasosa. Apenas uma pequena parcela do material orgânico é convertida em biomassa microbiana (cerca de 5 a 15%), vindo a constituir o lodo excedente do sistema. Além da pequena quantidade produzida, o lodo

excedente apresenta-se mais concentrado e com melhores características de desidratação.

O material não convertido em biogás ou em biomassa deixa o reator como material não-degradado (10 a 30%).

O sistema de tratamento de efluentes por fluxo intermitente ou em batelada, escolhido para o experimento, consiste na incorporação de todas as unidades, processos e operações - normalmente associados ao tratamento convencional de lodos ativados, quais sejam, decantação primária, oxidação biológica e decantação secundária - em um único tanque. Utilizando-se um tanque único, esses processos e operações passam a ser simplesmente seqüências no tempo, e não unidades separadas, como ocorre nos processos convencionais de fluxo contínuo.

O sistema consiste de um reator de mistura completa (batelada), onde ocorrem todas as etapas do tratamento. Isso é conseguido através do estabelecimento de ciclos de operação com durações definidas. A massa biológica permanece no reator durante todos os ciclos, eliminando, dessa forma, a necessidade de decantadores separados. Os ciclos de tratamento são:

- ✓ Enchimento: entrada do efluente bruto no reator;
- ✓ Reação: mistura da massa líquida contida no reator;
- ✓ Sedimentação: sedimentação e separação dos sólidos em suspensão do efluente em tratamento;
- ✓ Esvaziamento: retirada do efluente tratado do reator;
- ✓ Repouso: ajuste dos ciclos e remoção do lodo excedente.

O fluxograma do processo é muito simplificado, pela eliminação de diversas unidades, se comparado aos sistemas de lodos ativados de fluxo contínuo.

Os reatores são dimensionados de acordo com a carga orgânica a ser tratada, o volume do afluente, o tempo de detenção hidráulica necessária e a quantidade de lodo gerado no processo de tratamento. O

sistema é eficaz, pela separação das frações sólidas (lodo), líquida (efluente tratado) e gasosa (gás carbônico e metano), permitindo o aproveitamento de cada uma dessas frações na agricultura e como fonte de energia. Há um sistema de coleta do efluente e um de separação e captura dos gases; o lodo fica sedimentado no reator, sendo retirado o excesso, sempre que necessário. A liberação do biogás, formado pela digestão anaeróbia, de forma descontrolada na atmosfera é detrimental, não apenas pela possibilidade de ocorrência de maus odores junto à vizinhança, mas, principalmente, pelos riscos inerentes ao gás metano, que é combustível e também por contribuir para o efeito estufa. Dessa forma, o gás produzido deve ser coletado e utilizado na produção de energia para consumo na própria granja (podendo, assim, também, gerar créditos de carbono, segundo o Protocolo de Kioto), ou queimado.

O sistema de descarte do lodo destina-se à extração periódica do lodo que cresce em excesso no reator, possibilitando a retirada de material inerte que eventualmente venha acumular-se.

O interesse de se utilizar os reatores anaeróbios em batelada, como sistema de tratamento para os efluentes de suinocultura, decorre da facilidade operacional, por permitir a captura dos gases emanados (possibilitando, assim, verificar a degradação da matéria orgânica); por permitir a determinação dos parâmetros bioquímicos no efluente e no lodo (também, a fim de averiguar-se a degradação da matéria orgânica) e pela facilidade de obtenção da biomassa (de onde serão retiradas amostras para identificação das *Archaea*, um dos propósitos do presente estudo). Outra vantagem de se utilizar esse tipo de sistema de tratamento é que poderá ser avaliada a eficiência do sistema para tratamento dos efluentes de suinocultura, avaliando-se a eficiência da degradação da matéria orgânica, utilizando-se diferentes inóculos para *start* do reator.

Uma avaliação quantitativa e qualitativa do potencial microbiológico do efluente, bem

como do inóculo a ser utilizado, é importante para reduzir ao mínimo o período de adaptação e acelerar o processo de digestão. É necessário que haja compatibilidade entre as características do substrato e do inóculo (Campos, 1987).

2.4 Fundamentos da digestão anaeróbia

O número de espécies de microrganismos que coexistem em sistemas anaeróbios é muito grande. Soubes (1994) cita que em um biodigestor, que recebeu polímeros naturais, foram identificadas mais de 130 espécies diferentes. Dentre estas, ocorre a presença de bactérias, protozoários e fungos.

Os principais microrganismos empregados no processo anaeróbio, comentados por Malina (1992), são as bactérias e as arqueobactérias. A capacidade de uma bactéria anaeróbia decompor determinado substrato é específica, dependendo principalmente das enzimas que possui (as enzimas, responsáveis pelas reações do processo de decomposição, apresentam alto grau de especificidade). Mais informações sobre as reações enzimáticas podem ser obtidas em Pelczar et al. (1980).

A digestão anaeróbia representa um sistema ecológico balanceado, em que cada microorganismo desempenha função específica.

O crescimento de bactérias anaeróbias, relativo ao número de bactérias presentes, está relacionado às condições do meio. Existe uma fase de adaptação às variações destas condições, o que altera o processo de crescimento. Um excesso de matéria orgânica, substrato, pode causar competitividade entre os microrganismos presentes, refletindo em redução da reprodução ou até em morte.

Uma concentração de bactérias, submetidas a um meio de cultura, atravessa fases distintas. Metcalf e Eddy (1991) apresentam o perfil do crescimento-padrão de bactérias, dividindo-o em quatro fases:

- ✓ A fase de adaptação, ou fase *lag*: com a adição de um inóculo a um meio de

cultura, esta fase representa o tempo requerido pelo organismo para se adaptar ao novo meio e iniciar seu processo de divisão;

- ✓ A fase de crescimento logarítmico: durante este período, as células dividem-se à taxa determinada por seu tempo de geração e sua habilidade de alimentação;
- ✓ A fase estacionária: quando a população permanece estacionária. As razões para isso são: as células consumiram todo o substrato ou nutrientes para crescimento; ou o crescimento de novas células está equilibrado com a morte de células velhas; e,
- ✓ Fase endógena ou de decaimento: durante esta fase, a taxa de mortalidade bacteriana excede à de produção de novas células. Em alguns casos, a fase de morte logarítmica é o inverso da fase de crescimento logarítmico.

Em processos contínuos de tratamento biológico, deseja-se que a população bacteriana alcance seu máximo de crescimento, o que equivale à fase estacionária de crescimento. Desta forma, a matéria orgânica contida na água residuária é degradada com maior eficiência.

Os microrganismos metanogênicos, objeto do presente estudo, desempenham duas funções primordiais: utilizam o hidrogênio, favorecendo o ambiente para que as bactérias acidogênicas fermentem compostos orgânicos, com a produção de ácido acético, o qual é convertido num gás insolúvel (metano), possibilitando com isso a remoção do carbono orgânico do ambiente anaeróbio.

A digestão anaeróbia de compostos orgânicos complexos é, normalmente, considerada um processo em dois estágios. No primeiro, um grupo de bactérias facultativas e anaeróbias, denominadas formadoras de ácidos ou fermentativas, convertem os complexos orgânicos em outros compostos. Compostos orgânicos complexos, como carboidratos, proteínas e lipídeos são hidrolisados, fermentados e biologicamente convertidos em materiais orgânicos mais simples, principalmente, os

ácidos voláteis. No segundo estágio de conversão dos ácidos orgânicos, esses resultam em produtos finais gasosos, o metano e o gás carbônico. Essa conversão é efetuada por um grupo especial de microrganismos, denominados formadores de metano, os quais são estritamente anaeróbios (Nascimento, 1996.).

Segundo a autora, estes últimos dependem do substrato fornecido pelas bactérias acidogênicas, configurando, portanto, uma interação comensal. Uma vez que esses microorganismos são responsáveis pela maior parte da degradação do resíduo, a baixa taxa de crescimento e de utilização dos ácidos orgânicos normalmente representa o fator limitante no processo de digestão como um todo.

Os microrganismos que participam do processo de decomposição anaeróbia podem ser divididos em três importantes grupos, com compartimentos fisiológicos bem distintos:

- ✓ Bactérias fermentativas: transformam, por meio de hidrólise, os polímeros em monômeros e estes, em acetato, hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos de cadeia curta, aminoácidos e outros produtos, tal como a glicose;
- ✓ Bactérias acetogênicas: produzem hidrogênio, convertendo os produtos gerados na fase anterior (aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos e álcoois) em acetato, hidrogênio e dióxido de carbono;
- ✓ Microrganismos metanogênicos: usam o acetato e o transformam em metano e dióxido de carbono (metanogênicas acetoclásticas) ou produzem metano por meio da redução do dióxido de carbono (metanogênicos hidrogenotróficos). (Chernicharo, 1997).

Portanto, o processo de degradação anaeróbia pode ser subdividido em quatro fases principais, a saber:

Primeira fase - Hidrólise

Consiste na hidrólise de materiais particulados complexos (polímeros) em materiais dissolvidos mais simples

(moléculas menores), possibilitando que estes atravessem as paredes celulares das bactérias fermentativas. Essa conversão de materiais particulados em materiais dissolvidos é conseguida por meio da ação de exoenzimas excretadas pelas bactérias fermentativas hidrolíticas. Na anaerobiose, a hidrólise dos polímeros ocorre de forma lenta, sendo vários os fatores que podem afetar o grau e a taxa com que o substrato é hidrolisado, tais como: (i) temperatura operacional do reator; (ii) tempo de residência do substrato no reator; (iii) composição do substrato (ex.: teores de lignina, carboidrato, proteína e gordura); (iv) tamanho das partículas; (v) pH do meio; (vi) concentração de N - NH_4^+ ; e (vii) concentração de produtos da hidrólise (ex.: ácidos graxos voláteis). (Lettinga et al., 1996, citados por Chernicharo, 1997).

Segunda fase - Acidogênese

Os produtos advindos da fase de hidrólise são metabolizados no interior das células das bactérias fermentativas, sendo convertidos em diversos compostos mais simples, os quais são então excretados pelas células. Os compostos produzidos incluem ácidos graxos voláteis, álcoois, ácidos láctico, gás carbônico, hidrogênio, amônia e sulfeto de hidrogênio e, também, novas células bacterianas. Como os ácidos graxos voláteis são o principal produto dos organismos fermentativos, estas são usualmente designadas por bactérias fermentativas acidogênicas. (van Haandel e Lettinga, 1994; Lettinga et al., 1996; Chernicharo, 1997).

Ainda segundo esses autores, a acidogênese é efetuada por várias bactérias fermentativas, como exemplo *Clostridium* e *Bacteroids*. As primeiras constituem uma espécie anaeróbia, que forma esporos, sobrevivendo em ambientes adversos. As segundas encontram-se presentes no trato digestivo, participando da degradação de açúcares e aminoácidos. A maioria das bactérias acidogênicas é anaeróbia estrita, mas cerca de 1% é facultativa, podendo oxidar o substrato orgânico via oxidativa.

Terceira fase – Acetogênese

As bactérias acetogênicas são responsáveis pela oxidação dos produtos gerados na fase acidogênica em substrato apropriado para os microrganismos metanogênicos. Desse modo, esta fase é intermediária ao processo, fornecendo substrato à fase seguinte, metanogênica. Como produto gerado, tem-se: hidrogênio, dióxido de carbono e acetato.

Durante a formação dos ácidos acético e propiônico, grande quantidade de hidrogênio é formada, fazendo com que o pH do meio seja reduzido. O hidrogênio é consumido no meio pela ação de: (i) microrganismos metanogênicos, que o utilizam para produção de metano, juntamente com o dióxido de carbono, e (ii) reação de formação de ácidos orgânicos (propiônico e butírico), em que são utilizados hidrogênio, gás carbônico e ácido acético para tal reação. Nesse momento, cerca de 50% dos compostos biodegradáveis são convertidos em propionato e butirato, os quais são decompostos em acetato e hidrogênio pela ação das bactérias acetogênicas.

Quarta fase – Metanogênica

É a fase final do processo de degradação anaeróbia de compostos orgânicos em metano e dióxido de carbono, efetuada por microrganismos metanogênicos, dentro desse o grupo, as *Archaea* se inserem. Esses microrganismos utilizam número reduzido de substratos, quais sejam, ácido acético, hidrogênio e dióxido de carbono, ácido fórmico, metanol, metilaminas e monóxido de carbono. A importância dessa fase é consumir o hidrogênio produzido nas fases anteriores, além, é claro, de finalizar a digestão da matéria orgânica. Esses microrganismos podem ser subdivididos em dois subgrupos:

Metanogênicos acetoclásticos – são capazes de formar metano a partir do acetato. São predominantes na digestão anaeróbia, sendo responsáveis pela produção de 60 a 70% de todo o metano, a partir do grupo metil do ácido acético.

Pertencem a dois gêneros principais: *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (*Methanothrix*). O gênero *Methanosaeta* caracteriza-se por utilizar exclusivamente o acetato, tendo, por este, mais afinidade as metanosarcinas. Desenvolvem-se na forma de filamentos e têm importância na formação dos grânulos de bactérias. Os organismos pertencentes ao gênero *Methanosarcina* se desenvolvem sob a forma de cocos, que se agrupam formando “pacotes”. São mais versáteis porque utilizam, também, o hidrogênio e as metilaminas (Soubes, 1994; Chernicharo, 1997).

Metanogênicos hidrogenotróficos – são capazes de produzir metano a partir do hidrogênio e dióxido de carbono. Os gêneros mais freqüentemente isolados em reatores anaeróbios são: *Methanobacterium*, *Methanospirillum* e *Methanobrevibacter*.

2.5 Fatores que interferem na digestão anaeróbia

1) Nutrientes

De acordo com Malina (1992), os requerimentos nutricionais para o crescimento da massa microbiana e os fatores de crescimento são: energia, carbono, macronutrientes inorgânicos (nitrogênio e fósforo), micronutrientes inorgânicos (principais: enxofre, potássio, cálcio, magnésio, ferro, sódio e cloro; secundários: zinco, manganês, molibdênio, selênio, cobalto, cobre, níquel, vanádio e tungstênio) e fatores orgânicos de crescimento (vitaminas, aminoácidos, pirimidinas e outros).

A quantidade requerida de cada nutriente é variável, o que não o torna menos importante. Se o nutriente em questão não atingir a quantidade requerida, isto pode limitar o crescimento da massa microbiana. No entanto, se o nutriente exceder esta quantidade, pode assumir características tóxicas e inibir o crescimento da massa microbiana. Assim, os valores de interesse da concentração, de um determinado nutriente ao crescimento da massa

microbiana, estão compreendidos numa faixa determinada.

São os seguintes nutrientes, em ordem decrescente de quantidade requerida, necessários à estimulação nutricional de microrganismos metanogênicos: nitrogênio, enxofre, fósforo, ferro, cobalto, níquel, molibdênio, selênio, riboflavina e vitamina B₁₂.

O nitrogênio é o nutriente inorgânico requerido em maiores concentrações para o crescimento de microrganismos. A amônia e a porção de nitrogênio orgânico (NH₄) liberado durante a degradação são as principais fontes de nitrogênio utilizadas pelos microrganismos. Os requisitos de nitrogênio baseiam-se na composição química empírica da célula microbiana.

Biomassa com elevado coeficiente de produção celular (ex: efluentes de suinocultura) necessitam da seguinte proporção: C : N : P = 130 : 5 : 1.

O fósforo contribui para a digestão anaeróbia através da mediação de enzimas denominadas fosfatases e por ser incorporado pelas células em crescimento.

A maioria dos microrganismos metanogênicos utiliza o sulfeto como fonte de enxofre, embora alguns possam usar a cisteína. O enxofre é necessário para a síntese de proteínas. As necessidades desse elemento parecem ser da mesma ordem das de fósforo. Deve-se enfatizar que os requisitos de enxofre fazem parte de um balanço complexo. Por um lado, a presença de sulfatos pode limitar a metanogênese, porque as bactérias redutoras de sulfato competem por substratos como o hidrogênio e o acetato. Por outro, os microrganismos metanogênicos dependem da produção de sulfetos para seu crescimento.

A exigência exata de micronutrientes é difícil de ser determinada na prática, uma vez que a presença e necessidade de sulfetos pelas metanogênicas levam à precipitação destes elementos da solução, fazendo com que a concentração dos metais em equilíbrio seja

muito baixa, deixando os metais indisponíveis para estes microrganismos.

2) Temperatura

A temperatura tem importante efeito na sobrevivência e crescimento de bactérias, assim como na atividade de enzimas, sendo que o valor ótimo geralmente ocorre dentro de ampla faixa de valores.

As reações químicas são favorecidas com o aumento de temperatura. Porém, as enzimas que catalisam as reações metabólicas são estruturas muito complexas e sensíveis, de acordo com Pelczar et al. (1980). Temperaturas inadequadas podem destruir essas estruturas ou simplesmente inativá-las, prejudicando o comportamento bacteriano.

Sob variação de temperatura no sistema, mesmo que uma espécie de bactéria tolere esta variação ou que outras espécies sejam mais receptivas à nova temperatura, haverá perturbação nas atividades das bactérias presentes, alterando as concentrações dos produtos. Em sistemas anaeróbios de tratamento de efluentes, a temperatura deve variar o mínimo possível. (Nascimento, 1996).

Van Haandel e Lettinga (1994) comentam a dependência da digestão anaeróbia à temperatura, citando que há, na taxa de digestão anaeróbia de um sistema, máximo relativo de 35°C e máximo absoluto de 55°C, aproximadamente. Assim, abaixo de 45°C, distingue-se a região mesofílica e acima desta temperatura, a região termofílica.

Valores de temperatura entre 30°C e 40°C conferem uma taxa máxima de digestão anaeróbia; porém, para valores abaixo de 30°C, a taxa de digestão anaeróbia decresce a uma taxa de 10% por 1°C. Em temperaturas baixas, a fração de sólidos orgânicos, que pode ser metabolizada no processo, é reduzida. A digestão anaeróbia é possível sob baixas temperaturas, mas a eficiência e a taxa de digestão diminuem muito.

Os microrganismos produtores de metano, predominantes em reatores anaeróbios operados na faixa mesófila (30 a 35°C) de temperatura, são dos gêneros *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanospirillum*, que são os microrganismos utilizadores de hidrogênio e dos gêneros *Methanosarcina* e *Methanothrix*, os quais utilizam o acetato para a formação do metano. (Chernicharo, 1997)

3) pH

O pH é fator importante no crescimento das bactérias, sendo que a maioria delas não tolera pH acima de 9,5 ou abaixo de 4,0. Metcalf e Eddy (1991) citam a faixa ótima de pH para o crescimento de bactérias entre 6,5 e 7,5.

No processo anaeróbio, os diferentes grupos de bactérias podem apresentar faixas ótimas de pH com valores diferentes. Por exemplo, os microrganismos produtores de metano têm crescimento ótimo na faixa de pH entre 6,8 e 7,4, Zehnder et al. (1982). As bactérias produtoras de ácidos graxos voláteis, produtos gerados durante a decomposição anaeróbia, têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 (Chernicharo e Aroeira, 1994).

Os microrganismos metanogênicos são os mais sensíveis às variações do pH. O metabolismo lento desses microrganismos, em relação aos demais grupos (verificado, por exemplo, pelo tempo de duplicação da ordem de dias – 2,6 dias), faz com que sua adaptação às variações de pH seja também lenta. Assim, em sistemas de tratamento de efluentes por processo anaeróbio, o controle do pH deve satisfazer, primordialmente, a esse grupo.

O valor e a estabilidade do pH em sistemas anaeróbios são comentados por Van Haandel e Lettinga (1994) como sendo de extrema importância. Valores de pH menores que 6,3 ou maiores que 7,8 resultam em rápida diminuição na taxa de metanogênese. As bactérias acidogênicas são citadas como menos sensíveis.

O fato de as bactérias produtoras de ácido serem muito menos sensíveis ao pH que as metanogênicas é, particularmente, importante, uma vez que as bactérias acidogênicas podem ainda se mostrar bastante ativas, mesmo para valores de pH baixos, como 4,5. Na prática, isso significa que a produção de ácidos em um reator pode continuar livremente, apesar da produção de metano ter sido praticamente interrompida, devido aos baixos valores de pH. Como resultado, ter-se-á a acidificação do conteúdo do reator. (Chernicharo, 1997).

A estabilidade do pH está relacionada ao equilíbrio iônico dos diferentes sistemas ácido/base presentes. Os ácidos fracos (como os sistemas carbônico, fosfato, amônia, sulfato e ácidos voláteis) são os mais importantes para a estabilização do pH. Dentre esses, destaca-se o sistema carbônico (CO_2 - HCO_3^- - CO_3^{2-}), por estar presente em maior concentração.

2.6 Partida e operação de reatores anaeróbios

A partida dos reatores pode ser definida como o período transitório inicial, marcado por instabilidades operacionais. O início da operação de um biodigestor, *start up*, partida do processo, é o maior problema que ocorre no tratamento de efluentes por digestão anaeróbia. A maior dificuldade parece ser o desenvolvimento de uma comunidade microbiana adequada para o resíduo em questão. Basicamente, a partida pode ser conseguida de três formas distintas:

- ✓ **Utilizando-se lodo de inóculo adaptado ao efluente a ser tratado:** a partida do sistema ocorre de forma rápida e satisfatória, não havendo necessidade de aclimação do lodo;
- ✓ **Utilizando-se lodo de inóculo não adaptado ao efluente a ser tratado:** neste caso, a partida do sistema passa por um período de aclimação, incluindo uma fase de seleção microbiana;
- ✓ **Sem a utilização do lodo de inóculo:** esta é considerada a forma mais desfavorável de se proceder a partida do sistema, uma vez que haverá necessidade de se inocular o reator com

os próprios microrganismos contidos no efluente. Como a concentração de microrganismos no efluente é muito pequena, o tempo demandado para a retenção e seleção de uma elevada massa microbiana pode ser bastante prolongado (da ordem de 4 a 6 meses).

A inoculação pode-se dar tanto com o tanque cheio ou vazio, embora seja preferível com ele vazio, a fim de diminuir as perdas de lodo, durante o processo de sua transferência.

Lettinga et al. (1980) recomendam preencher 10 a 20% do reator com inóculo e, então, completar o volume total com o resíduo a ser tratado. Em reatores de leito fixo, a quantidade de inóculo deve corresponder, no mínimo, a 10% do volume do reator.

2.7 As Archaea

Archaea, anteriormente denominadas arqueobactérias (Staley e Holt, 1989), são microrganismos procarióticos, evolutivamente distintos dos procariotos alocados no domínio *Eubacteria*. *Archaea*, é um dos três domínios propostos por Woese e Fox (1990).

O Domínio *Archaea*, é um conceito relativamente recente, é reconhecido como um grupo importante e independente de seres vivos, obtido a partir dos trabalhos de Carl Woese et al. (1990).

Fenotipicamente, as *Archaea* são muito parecidas com as Bactérias. A maioria são pequenas (0.5-5 micras) e em forma de bastonetes, cocos e espirais. As *Archaea*, geralmente, reproduzem-se por divisão binária, como a maioria das Bactérias. Os genomas das *Archaea* são do tamanho de 2-4 Mbp, similar à maioria das Bactérias. A maior parte das *Archaea* são termófilas. A maioria, também, é autotrófica ou dependente de enxofre. Como os Eucariotas, as *Archaea* têm abundantes proteínas similares à histona e ao DNA que se concentra em forma de nucleosomas.

Este grupo de microrganismos, também, se distingue pela organização do genoma, mecanismos de expressão e regulação gênica, e pela diversidade metabólica e fisiológica (Madigan et al., 1997).

A organização global de sua membrana celular é similar à encontrada nas Bactérias e nos Eucariotas. As *Archaea* podem alterar a espessura de sua membrana, incluindo anéis pentacíclicos em sua estrutura. Contêm grande quantidade de lipídios nos pólos.

Muitas *Archaea* sobrevivem em condições que matariam outros microrganismos: água fervente, lagos super salgados, fissuras vulcânicas que desprendem enxofre, água ácida e no gelo antártico. Esses tipos de *Archaea* se denominam extremófilos, o que significa que são seres que toleram condições extremas.

Existem três tipos principais: as *Crenarchaeota*, caracterizadas por sua habilidade em tolerar condições extremas de temperatura e acidez; as *Euriarchaeota*, que incluem as produtoras de metano e que toleram ambiente salgado; as *Korarchaeota*, uma divisão descrita recentemente, que engloba organismos hipertermófilos pouco conhecidos, ainda não cultivados em laboratório.

Dentro desses tipos principais existem alguns sub-tipos:

- ✓ Metanogênicas: *Archaea* que produzem metano como um produto final de sua "digestão", o processo de elaboração de energia (ATP). Essas serão objeto de estudo, nessa avaliação em efluentes advindos do processo produtivo suinícola;
- ✓ Halófilas: as que vivem em ambientes salgados;
- ✓ Termófilas: que vivem em temperaturas extremamente altas;
- ✓ Sicrófilas: que vivem em temperaturas muito baixas.

O conhecimento científico sobre *Archaea* vem crescendo rapidamente nos últimos anos, com aplicação de metodologias moleculares adequadas ao estudo de

organismos ainda não cultivados em laboratório e em habitats naturais. A amplificação e análise filogenética de genes ribossomais (DNAr ou RNAr 16S) é a ferramenta mais utilizada nestes estudos. São conhecidas 108 espécies de *Archaea* com descrição válida na literatura internacional (<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>).

No Brasil, há poucos relatos do isolamento e identificação de espécies de *Archaea*, sendo estes principalmente relacionados a estudos em processos de tratamento de efluentes e produção de metano.

Apesar da grande utilização de sistemas de digestão anaeróbia para tratamento de efluentes e resíduos, no Brasil, a realização de estudos relacionados à diversidade e sistemática de *Archaea* é ainda incipiente.

2.8 Bioquímica da digestão anaeróbia

Os ácidos graxos voláteis intermediários são os precursores na formação do metano, sendo os mais importantes o acético e o propiônico. O ácido propiônico resulta, principalmente, da fermentação dos carboidratos e proteínas presentes, sendo que cerca de 30% do composto orgânico são convertidos nesse ácido, antes que possa ser convertido em metano. O ácido acético é o ácido intermediário mais freqüente, sendo formado a partir de todos compostos orgânicos. Cerca de 15% da produção de metano advém de outros ácidos, como o fórmico e o butírico. (Chernicharo, 1997)

2.9 Formação do metano

Em que pese as rotas individuais envolvidas na formação de metano ainda não estarem completamente estabelecidas, algum progresso tem sido obtido atualmente, nesse sentido. Sabe-se que alguns microrganismos metanogênicos são capazes de utilizar somente o hidrogênio e o gás carbônico para o seu crescimento e formação de metano, enquanto outros são capazes de utilizar o ácido fórmico, o qual é, antes, convertido em hidrogênio e gás carbônico.

Conforme já mencionado, existem duas rotas básicas para a formação de metano: (i) pela clivagem do ácido acético e (ii) pela redução do gás carbônico.

Na ausência de hidrogênio, a clivagem do ácido acético conduz à formação de metano e gás carbônico. O grupo metil do ácido acético é reduzido a metano, enquanto o grupo carboxílico é oxidado a gás carbônico:

$C^* \text{HCOOH} \Rightarrow C^* \text{H}_4 + \text{CO}_2$ - Grupo microbiano envolvido: metanogênicos acetoclásticos.

Quando o hidrogênio encontra-se disponível, maior parte do metano restante é formado a partir da redução do gás carbônico. O CO_2 atua como aceptor dos átomos de hidrogênio removidos dos compostos orgânicos pelas enzimas. O mecanismo de formação de metano, a partir da redução do dióxido de carbono, é o seguinte:

$\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \Rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$ - Grupo microbiano envolvido: metanogênicos hidrogenotróficos. (Chernicharo, 1997)

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida em reatores anaeróbios em batelada, instalados na EMBRAPA – CNPMS (Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo), localizado no Município de Sete Lagoas, a 70km de Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais; Coordenadas: 44°15'08" de longitude e 19°28' de latitude; Altitude: 732m. De acordo com dados obtidos junto à Prefeitura Municipal de Sete Lagoas, a temperatura média mínima anual do município é de 15,2°C; a média máxima anual é de 28°C; média anual é de 22,9°C; índice médio pluviométrico anual é de 1403mm.

Os efluentes foram coletados em uma granja de suínos localizada no município de São José da Lapa, a 20 km de Belo Horizonte. A granja possui um plantel de 50 matrizes e adota o regime de ciclo completo.

A alimentação dos animais é fornecida com ração balanceada, misturada na propriedade, respeitando-se as exigências nutricionais de cada fase produtiva. A limpeza da granja é feita diariamente, sendo os galpões lavados por jatos de água sob pressão. O efluente foi coletado no momento da limpeza dos galpões, no tanque decantador, no tanque de

decantação, abaixo do cano de entrada de efluente bruto, conforme demonstrado na Figura 1, a seguir.

O sistema de tratamento dos efluentes gerados na granja consiste em uma separação da fase sólida, por decantação, e a fase líquida é destinada a duas lagoas de estabilização.

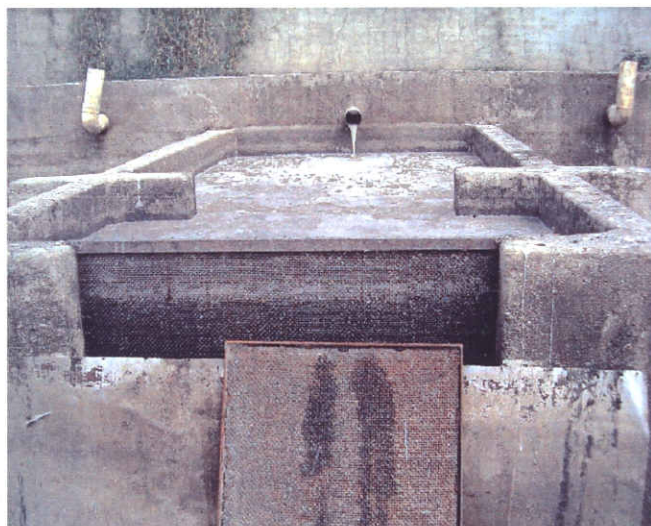


Figura 1: Foto do tanque-decantador, local de coleta do efluente bruto.

3.1 Caracterização dos reatores utilizados

Os reatores experimentais projetados foram considerados como um digestor de baixa carga, pois, segundo Chernicharo (1997), não dispõem de dispositivos de mistura, sendo usualmente constituídos por um só tanque, onde ocorrem, simultaneamente, a digestão, o adensamento do lodo e a formação do sobrenadante. Do ponto de vista operacional, o lodo bruto é adicionado na parte do digestor em que o lodo está sendo ativamente digerido e o biogás liberado. Esse tipo de reator promove a estabilização de lodos primários e secundários, no tratamento de efluentes industriais com elevada concentração de sólidos suspensos. Com o movimento ascendente do biogás, partículas de lodo e de outros materiais flutuantes são levadas para a superfície, vindo constituir uma

camada de espuma. Como resultado da digestão, ocorre a estratificação do lodo abaixo da camada de espuma, configurando-se quatro zonas distintas dentro do reator, que são: na parte superior, a (i) zona de espuma; (ii) zona de sobrenadante; (iii) zona de digestão ativa e, no fundo, (iv) zona de lodo estabilizado.

Os reatores foram construídos com PVC, em forma cilíndrica e posicionados na vertical, com 300mm de diâmetro e 50cm de altura, tampados com placas, também em PVC, com 5mm de espessura. Para assegurar a vedação total dos reatores, uma vez que são anaeróbios, neles foram colocadas borrachas, de 8mm de espessura. Além da vedação com borracha, foram instaladas oito presilhas em cada reator, fixando bem a tampa ao corpo, conforme ilustra a figura 2, a seguir.

Para a saída do gás, na parte superior do reator, foi instalado um bico de gás, em alumínio, para que fosse possível a mensuração da quantidade de gás produzida e para possibilitar a coleta de gás para análise qualitativa. O gás era coletado por meio de mangotes e seringas agulhadas de 60ml. Para mensuração da quantidade de gás produzida, foi instalado um sistema construído com garrafas Pet de 2 litros, cortadas ao meio. Nessas garrafas foram colocadas escalas graduadas de 1 em 1 centímetro, e a produção de gás era medida por meio do deslocamento da garrafa, em

centímetro. Durante o segundo ciclo do experimento, foi construído um gasômetro de PVC, pois este material é mais resistente e durável, seguindo a mesma metodologia de mensuração dos gases.

O segundo modo de mensuração do gás produzido foi realizado com o uso de um medidor de fluxo.

Os reatores ficaram assentados em uma bancada de madeira, em ambiente arejado, porém sem incidência direta de sol ou chuva.



Figura 2: Foto dos reatores construídos para o desenvolvimento da pesquisa.

3.2 Definição do experimento

O experimento foi instalado com o objetivo de se estudar a eficiência de fermentação de reatores de batelada e isolar os microrganismos metanogênicos que participam da digestão de matéria orgânica de suínos, tendo como foco o grupo *Archaea* metanogênicas. Também, para analisar a eficiência dos reatores anaeróbios em batelada no tratamento desse tipo de efluente, visando viabilizar um sistema de tratamento de efluentes para as propriedades onde há dificuldade para a instalação do sistema de lagoas de

estabilização, devido à falta de espaço físico e/ou de topografia favorável. A avaliação quantitativa e qualitativa dos gases produzidos constitui importante objeto do estudo.

O experimento foi conduzido com três repetições (utilizando dois inóculos diferentes, em concentração pré-determinada e sem inóculo qualquer), em paralelo, a fim de se verificar se haveria diferença no processo de digestão e determinar qual a microbiota responsável pela degradação da matéria orgânica.

Desse modo, foram definidos três diferentes tratamentos, a saber:

- ✓ **Reatores 1, 2 e 3:** 24,0 litros de efluente bruto de suinocultura + 1,2 litros de inóculo de suíno.
- ✓ **Reatores 4, 5 e 6:** 24,0 litros de efluente de suinocultura + 1,2 litros de inóculo de bovino.
- ✓ **Reatores 7, 8 e 9:** 25,2 litros de efluente de suinocultura (sem inóculo).

Preparo do inóculo de dejetos de suíno: os dejetos foram obtidos no tanque de decantação da granja (fresco). Foram coletados 2,5 kg de dejetos de suíno (fração sólida), que foram diluídos em 10 litros do efluente bruto, em um balde. Desse volume, foi retirado 1,2 litro da mistura e utilizada como inóculo.

Preparo do inóculo de dejetos de bovino: foram coletados 2,5kg de dejetos frescos de bovino, com 18% de Matéria Seca. Esses dejetos foram diluídos em 10 litros de efluente bruto de suinocultura, em outro balde, foram misturados, e foi retirado 1,2 litro da mistura e adicionado na bateria de reatores (reatores 4,5,6).

O Tempo de Detenção Hidráulica (TDH), foi definido em um experimento-piloto, em que foram colocados 25 litros de efluente bruto de suinocultura, no reator de batelada, a fim de se determinar o período de início e término da produção de gás, o que indicaria, de forma indireta, a degradação da matéria orgânica existente no efluente. Esse experimento-piloto foi realizado com duas repetições. Portanto, a partir desse experimento-piloto, foi definido que o TDH seria de 75 dias.

3.3 Análises físicas, químicas e bioquímicas

Para as análises físicas, químicas e biológicas dos efluentes foram coletadas

amostras, no início do experimento, do afluente (sem qualquer tratamento anterior) e do efluente, após o ciclo de tratamento de 75 dias. Para a realização das análises, foram coletados 4 litros de efluente (bruto e de cada reator). As análises físicas, químicas e biológicas foram realizadas no CNPMS/EMBRAPA e no laboratório de análise de água do DESA - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Faculdade de Engenharia da UFMG, em Belo Horizonte/MG, seguindo-se a metodologia utilizada nesses laboratórios. Os parâmetros analisados foram:

- ✓ pH;
- ✓ Nitrogênio Total;
- ✓ Fósforo Total;
- ✓ Potássio;
- ✓ Cálcio;
- ✓ Magnésio;
- ✓ Enxofre;
- ✓ Matéria Seca;
- ✓ Zinco;
- ✓ Ferro;
- ✓ Cobre;
- ✓ Sódio;
- ✓ Carbono;
- ✓ Relação C/N;
- ✓ DBO₅.

3.4 Análise quantitativa do biogás

A primeira mensuração da quantidade de gás produzido foi por meio das garrafas Pet's (deslocamento em cm) e, também, foi construído um gasômetro de PVC, medindo-se o deslocamento em centímetro. A segunda mensuração do gás produzido foi realizada através do uso de um medidor de fluxo. Abriu-se o fluxo de gás, através das borrachas dos gasômetros, e quando passava o gás pelo medidor, tinha-se, então, o gás medido em ml/min de gás produzido.



Figura 3: Foto dos gasômetros construídos em garrafas pet.

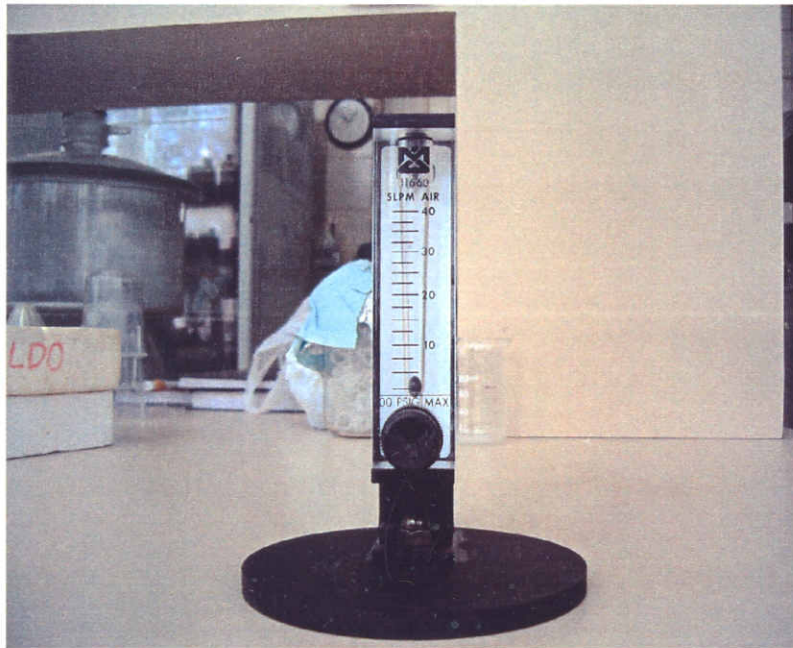


Figura 4: Foto do medidor de fluxo.

3.5 Análise qualitativa do biogás

A análise qualitativa do biogás foi realizada somente na segunda etapa do experimento, no laboratório de Análise de Efluentes Atmosféricos do DESA/UFMG, por cromatografia gasosa, utilizando-se o cromatógrafo de marca Perkin Elmer – Auto System XL. As determinações das porcentagens de metano e gás carbônico, contidos nas amostras de biogás, foram feitas, comparando-se gráficos das amostras com o gráfico de um gás-padrão. As análises foram feitas quinzenalmente.

Para coleta do gás foram utilizadas seringas de 60 mL, adaptadas em sua ponta com "three way" utilizados para administração de soro hospitalar. Esse dispositivo permitiu "selar" a saída e assegurou que não houvesse extravasamento do gás, do local do experimento até o laboratório. Antes da coleta da amostra, as seringas foram lavadas e ambientadas com três aspirações e descartes consecutivos, para se evitar a interferência de gases atmosféricos.

O procedimento para a análise foi o seguinte:

- ✓ Injetou-se gás Hélio no aparelho, a fim de "lavar" todo equipamento;
- ✓ Injetou-se gás - padrão, com as proporções dos gases conhecidas (47% de gás metano, 25% de gás carbônico, 2,015% de hidrogênio e 0,514% de monóxido de carbono). Repetiu-se esse procedimento, para certificar-se de que a leitura da amostra foi feita corretamente. Fez-se, então, a leitura das amostras.

3.6 Avaliação quantitativa da população bacteriana

A diversidade microbiana foi avaliada no cultivo em placa Petri, em ágar batata, meio não seletivo. A diversidade foi pesquisada tanto no afluente quanto no material contido nos reatores, onde ocorreu degradação de parte da matéria orgânica e nos reatores que não funcionaram. O objetivo era comparar a diversidade microbiana no afluente com a biodiversidade naqueles reatores que degradaram a matéria

orgânica, verificando se houve alteração dessas colônias.

As amostras foram coletadas dos reatores, no início e no final de cada ciclo (batelada), ou seja, no dia zero e no 75º dia. As amostras foram diluídas em solução salina (0,85% de NaCl). Para a contagem da população microbiana, foram retiradas alíquotas de 100 µL para realizar uma diluição seriada decimal, e essas foram plaqueadas, em duplicatas, em meios definidos, citados a seguir. As populações (unidade formadora de colônia, UFC mL⁻¹) de microrganismos foram estimadas em meio de ágar-batata. Após a incubação, as colônias de microrganismos anaeróbios foram estimadas nos meios, já citados, após a incubação em câmaras de anaerobiose.

Para composição do ágar batata foram utilizados os seguintes componentes:

- ✓ Batata: 200 g/L;
- ✓ Ácido málico + KOH: 2,5 g/L;
- ✓ Açúcar cristal: 2,5 g/L;
- ✓ Vitamina: 1mL;
- ✓ Solução de micronutrientes NFb: 2 mL.

O procedimento para Contagem da População Microbiana em dejetos de suíno foi o seguinte:

- ✓ Utilizaram-se 10 amostras do dejetos de suíno do afluente e dos reatores em que houve degradação da matéria orgânica (reatores 1, 2 e 3) e dos reatores que não funcionaram (4, 5, 6, 7, 8, e 9);
- ✓ Foi pipetado 1 mL de cada amostra, previamente homogeneizada e transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina a 0,85%;
- ✓ A partir desta primeira diluição, foram feitas mais três diluições: 10⁻²; 10⁻³ e 10⁻⁴;
- ✓ Foi utilizado o meio BDA para inoculação de 100µL das diluições 10⁻²; 10⁻³ e 10⁻⁴;
- ✓ As alíquotas de 100µL das diluições foram espalhadas no meio de cultura, utilizando-se a alça de Drigalsk esterilizada;
- ✓ As placas foram incubadas em temperatura ambiente e na posição invertida, para que não houvesse condensação da água do meio de cultura, na tampa da placa de Petri;

- ✓ Foi feita a primeira avaliação após 72 horas de incubação.

Para o cálculo das UFC/mL foi multiplicada a média do número de colônias observadas pelo o inverso da diluição.

3.7 Identificação de *Archaea*

A avaliação de alterações da estrutura da comunidade de *Archaea*, bem como sua identificação, foi efetuada por meio do método proposto por Muyzer et al. (1993).

O mérito maior desta metodologia, baseada em análises de ácido nucléicos, é permitir a identificação de microrganismos de uma amostra qualquer, independente de seu cultivo *in vitro*. A variabilidade nas seqüências de rDNA 16S foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (DGGE), técnica essa desenvolvida por este autor, que consiste na separação dos fragmentos de DNA (principalmente, do rDNA 16S) em gel de poliacrilamida contendo um gradiente linear de formamida e uréia. As variações na composição de nucleotídeos dos diferentes fragmentos de DNA determinam seu comportamento de migração em posições diferentes (Muyzer et al., 1998). O comportamento de migração do fragmento de DNA no DGGE é governado não apenas pela composição de nucleotídeos (contendo G + C), mas também pelas interações entre eles dentro da molécula.

Para análise do perfil microbiano pela técnica de DGGE e identificação de espécies, foi extraído o DNA do total do sedimento das seguintes amostras: amostras de 1 a 9 representando os reatores com mesmo número, do segundo ciclo do experimento. A amostra n^o. 10 foi obtida do afluente do primeiro ciclo do experimento. A amostra n^o. 11 foi obtida do afluente do segundo ciclo do experimento. A amostra n^o. 12 foi obtida de uma amostra composta dos reatores 1 e 2 do primeiro ciclo do experimento (reatores que funcionaram).

A extração do DNA total de microrganismos presentes nas amostras

foi realizada por meio de análise mecânica e purificação, utilizando o Kit FastDNA Spin for soil (Bio101). Os DNAs totais extraídos foram amplificados em reação de PCR (reação em cadeia da enzima RNA polimerase) com iniciadores específicos. Para o DGGE de *Archaea* foi realizado um primeiro PCR com os primers específicos para *Archaea* (**Ar4f**: 5'- TCY GGT TGA TCC TGC CRG -3' ; **Ar25f**: 5' - CYG GTY GAT YCT GCC RG -3' ; **Ar958r**: 5' - YCC GGC GTT GAM TCC AAT T -3' ; **Un1492r**: 5' - GGT TAC CTT GTT ACG ACT T -3') e posteriormente um segundo PCR (nested) para introdução do grampo de CG (clamp) nos amplicons do primeiro PCR.

Para realização do DGGE de bactérias utilizaram-se os iniciadores universais para bactérias (F968 CG e R1401). As reações de PCR foram realizadas a: 94°C por 1 min, 55°C, por 1 min e 72°C por 3 min (35 vezes); 72°C por 10 min. A idéia básica consiste em separar, pelo aquecimento, as fitas de DNA contendo o segmento a ser amplificado e permitir, por resfriamento lento, o seu pareamento com oligonucleotídeos contendo seqüências específicas ("primers"), que servem como iniciadores para a síntese de DNA. A incubação na presença de DNA polimerase e nucleotídeos trifosfato permite a extensão da cadeia a partir do "primer". A realização deste procedimento repetidas vezes oferece a amplificação em progressão geométrica da seqüência em questão.

Após a reação de PCR, os amplicons do rDNA foram separados por eletroforese em gel de gradiente (DGGE). A eletroforese foi realizada em unidade de DGGE da Biorad (Richmond, USA). Os gradientes foram formados a partir de soluções estoque de poliacrilamida (6%) contendo 0% e 100% de desnaturantes (uréia e formamida desionizada). Os produtos de PCR foram aplicados em gel contendo 6% de poliacrilamida, com gradiente de desnaturantes de 45% a 65%. As condições de eletroforese foram de 16h a 60°C e 70V em tampão TAE 1X. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado em câmera digital.

As bandas importantes foram cortadas do gel com lâmina de bisturi cirúrgico. Elas foram eluídas em 50 µL de água ultrapura por aproximadamente 2 horas, sob temperatura ambiente e por 2 horas sob temperatura de -20°C. Depois de centrifugadas por 1 min, cerca de 5µL do DNA eluído de cada banda do DGGE foi reamplificado, seguindo-se cada condição específica de PCR, como já descrito anteriormente. Em seguida, alíquotas de 30 µL dos produtos amplificados foram aplicadas em um gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídio e mais uma vez excisados do gel, sendo posteriormente purificados usando-se o Kit Qiagen para purificação do produto de PCR extraído do gel. As seqüências de DNA eluídas de cada banda de DGGE e purificadas foram reamplificadas por PCR usando o kit Big Dye Terminator v3.1. Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Os fragmentos de DNA foram inseridos no seqüenciador capilar ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

As seqüências geradas foram alinhadas com seqüências disponíveis em banco de dados, utilizando-se o GCG - programa de computador - e pesquisadas, utilizando-se o "BLAST Sequence Similarity Search".

Portanto, a diversidade genética obtida no gel de DGGE, foi determinada pelo número de amplicons presentes em cada amostra. A similaridade entre as estruturas de comunidades de *Archaea* foi determinada com base na presença ou ausência de bandas detectadas no gel. Os dados obtidos foram analisados por meio de análises de *cluster* (programa STATISTICA). No final, foi estudado o relacionamento da diversidade das populações de *Archaea* e os parâmetros da biodigestão. As técnicas de isolamento, cultivo, extração de DNA foram obtidas junto ao CNPMS da EMBRAPA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

São apresentados e discutidos, a seguir, os resultados obtidos.

Os reatores de n^{os} 1, 2 e 3 que funcionaram dentro do ciclo estabelecido de 75 dias. Esses reatores receberam inóculo de suíno. Os reatores de n^{os} 4 a 9 não funcionaram, dentro do ciclo de 75 dias. Esses reatores receberam inóculo de bovino (não adaptado - 4,5 e 6) ou não receberam inóculo (7,8 e 9). Não foi possível identificar os motivos pelos quais esses reatores não tiveram funcionamento pleno como os demais. Foi descartada a possibilidade de vazamento de gás, e de entrada de oxigênio. Porém, não foram avaliados os parâmetros físico, químicos e biológicos, a fim de diagnosticar algum toxicidade ou desequilíbrio no sistema que pudesse prejudicar o desenvolvimento da biomassa.

4.1 Análises físicas, químicas e bioquímicas

As análises físicas, químicas e bioquímicas foram realizadas retirando-se amostra do afluente e efluentes dos reatores que funcionaram (1, 2 e 3). Para obter a amostra dos reatores 1, 2 e 3 foram retirados 2 litros de efluentes de cada um dos três reatores, que foram misturados em balde, limpo e seco, de onde se retirou 2 litros de efluente para análise (amostra composta).

Tabela 2 : Resultados da análise física, química e biológica – Primeiro ciclo do experimento.

Parâmetros	Afluente (mg/L)	Efluente Reatores que funcionaram 1, 2, 3.(mg/L)	Parâmetros da DN COPAM 010/86
pH	6,9	7,3	Atende
Nitrogênio Total	979,4	474,3	Depende da classe da água
Fósforo	160,0	23,6	Depende da classe da água
Potássio	411,2	236,2	Depende da classe da água
Carbono	3.046,0	654,9	Depende da classe da água
Cálcio	289,9	76,2	Depende da classe da água
Magnésio	61,2	12,9	Depende da classe da água
Enxofre	78,8	21,4	Depende da classe da água
Disponível			
DBO ₅	5.239,0	2.122,0	Não atende
Zinco	12,6	1,2	Atende
Ferro	22,7	09,8	Atende
Cobre	9,6	0,4	Atende
Manganês	3,7	0,3	Atende
Sódio	96,4	31,0	Depende da classe da água

Obs.: Nessa amostra, o teor de matéria seca (M.S. 65°C) no efluente bruto foi de 3,52 g/L.

Segundo a Deliberação Normativa COPAM n°.010/86, que delibera sobre o lançamento de efluentes em corpos d'água e os classifica quanto à qualidade de água, tem-se:

Art. 12: "Nas águas de Classe Especial não serão tolerados lançamentos de águas residuárias, domésticas e industriais, lixo e outros resíduos sólidos, substâncias potencialmente tóxicas, defensivos agrícolas, fertilizantes químicos e outros poluentes, mesmo tratados." E ainda: Art. 13.: "Nas águas das Classes 1 a 4 serão tolerados lançamentos de despejos, desde que, além de atenderem ao disposto no Art. 15 desta Deliberação Normativa, não venham a fazer com que os limites estabelecidos para as respectivas classes sejam ultrapassados."

Art. 15:"Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos d'água, desde que obedeçam às seguintes condições:

- pH entre 6,5 e 8,5 (+/- 0,5);
- temperatura: inferior a 40°C, sendo que a elevação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C;

- materiais sedimentáveis: até 1ml/litro em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;
- regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vezes a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor;
- óleos e graxas: óleos minerais até 20 mg/L e óleos vegetais e gorduras animais até 50 mg/L;
- ausência de materiais flutuantes;
- DBO₅ dias a 20°C: no máximo de 60 mg/L (este limite só poderá ser ultrapassado no caso do sistema de tratamento de águas residuárias reduzir a carga poluidora do efluente, em termos de DBO5 dias a 20°C do despejo, em , no mínimo de 85%.);
- DQO: no máximo de 90 mg/L (este limite só poderá ser ultrapassado no caso do sistema de tratamento de águas residuárias reduzir a carga poluidora do efluente, em termos de DQO do despejo, em, no mínimo, 90%);
- Sólidos em suspensão: uma concentração máxima diária de 100 mg/L

- ou uma concentração média aritmética mensal de 60 mg/L;
- j. Valores máximos admissíveis de algumas substâncias: (valores importantes em suinocultura):
Amônia: 5,0 mg/L;
Cobre: 0,5 mg/L;
Zinco: 5,0 mg/L.
 - l. Tratamento especial, se provierem de hospitais e outros estabelecimentos nos quais haja despejos infectados com microorganismos patogênicos."

O pH variou dentro dos limites considerados satisfatórios para atividade metanogênica, estando no limite superior, naqueles efluentes que estavam nos reatores que funcionaram. A pouca variabilidade do pH indica bom funcionamento desses reatores, pois não houve acidificação do meio, o que poderia culminar na redução da atividade metanogênica destes. O pH no efluente final ficou dentro dos parâmetros exigidos na DN COPAM 010/86. A acidificação de um reator indica a prevalência da atividade das bactérias acidogênicas e, conseqüentemente, redução da biodiversidade metanogênica, pois esses microrganismos não toleram meios ácidos, reduzindo a eficiência de tratamento dos efluentes. Quando uma população de microrganismos metanogênicos encontra-se em quantidade suficiente e as condições ambientais no interior do sistema de tratamento são favoráveis, estas utilizam os ácidos intermediários tão rapidamente quanto estes são formados. Como resultado, os ácidos não se acumulam no meio e o pH permanece numa faixa favorável aos microrganismos metanogênicos e o sistema anaeróbio é considerado em equilíbrio.

Com relação aos parâmetros de N, P, K, DBO, os resultados foram inferiores ao exigido na legislação ambiental (DN COPAM 010/86), porém, é importante ressaltar que o tratamento de efluentes de suinocultura, por terem cargas orgânicas elevadas, é realizado em várias etapas. Comumente, faz-se, numa primeira etapa, a separação da fração líquida da sólida (o que já reduz a carga orgânica em cerca de 20%, de acordo com a literatura); a segunda

etapa, faz-se por meio de um processo biológico (onde os reatores substituiriam as lagoas de estabilização) e, se necessário for, há ainda uma terceira etapa de tratamento, que consiste na passagem do efluente por uma lagoa de maturação ou de polimento, a fim de finalizar o tratamento e permitir o atendimento da norma ambiental.

O nitrogênio teve eficiência de redução de sua concentração de 51,58%, quando comparado o afluente com o efluente tratado. A eficiência de redução da concentração de fósforo foi de 85,22%. Para potássio, esta eficiência foi de 42,56%. Essas reduções nesses parâmetros irão atender ou não à legislação ambiental, dependendo da classificação de qualidade de água do corpo receptor, quando os padrões exigidos são mais ou menos restritivos. De um modo geral, a análise de eficiência de um sistema de tratamento de efluentes são observados dois parâmetros DBO₅ e DQO.

A eficiência de redução da DBO₅ foi de 59,51%. A DN COPAM 010/86, que dispõe sobre a classificação de corpos d'água e do lançamento de efluentes, determina uma eficiência de tratamento de efluentes de, no mínimo 85%, ou que o valor final seja inferior à 60 mg/L. Como pode-se observar, a eficiência dos reatores anaeróbios em batelada, para o parâmetro DBO₅ foi inferior ao exigido na legislação. Porém, cabe ressaltar que, não foi realizado o tratamento primário nos afluentes dos reatores, sendo colocados o afluente com fração sólida mais fração líquida para encher os reatores.

Com relação ao carbono total, esse teve uma eficiência na remoção de 78,49%. Esse carbono foi retirado do sistema através da formação dos gases metano e CO₂, portanto, sua redução se deu pela transformação em produtos gasosos.

Se considerarmos que foi colocado o afluente nos reatores anaeróbios, sem qualquer tipo de tratamento anterior e se obteve redução média, dos parâmetros, da ordem de 50%, alguns parâmetros em quase 80%, pode-se concluir que esse sistema de tratamento tem uma eficiência

média no tratamento desse tipo de efluente. Há necessidade de realizar uma repetição do experimento, agora, utilizando como afluente apenas a fração líquida dos efluentes de suinocultura e avaliar se a eficiência do sistema atinge aos parâmetros exigidos na legislação ambiental vigente.

Para os micronutrientes, os mais importantes em suinocultura são cobre e

zinco, utilizados na alimentação dos animais como promotores de crescimento, e, por isso, encontram-se em concentrações elevadas nos efluentes. Considerando a eficiência de remoção desses dois elementos, pode-se concluir que os reatores foram eficazes. Com efeito, o zinco teve uma redução de 90,24% e o cobre, de 95,57%, atingindo ao padrão exigido na legislação ambiental vigente.

Tabela 3 : Resultados das análises físicas, químicas e biológicas – Segundo ciclo do experimento.

Parâmetros	Afluente (mg/L)	Efluente reatores 1, 2 e 3 (mg/L)	Parâmetros da DN COPAM 010/86
pH	6,6	7,7	Atende
Nitrogênio Total	1.540,1	954,3	Depende da classe da água
Fósforo	410,2	63,6	Depende da classe da água
Potássio	431,6	296,3	Depende da classe da água
Carbono	6.262,0	923,6	Depende da classe da água
Cálcio	545,4	145,8	Depende da classe da água
Magnésio	183,7	32,0	Depende da classe da água
Enxofre Disponível	129,5	54,0	Depende da classe da água
DBO ₅	5.100,0	2.414,0	Não atende
Zinco	18,3	3,6	Atende
Ferro	50,6	14,0	Não atende
Cobre	23,8	7,0	Não atende
Manganês	5,8	1,4	Não atende
Sódio	102,6	91,0	Depende da classe da água
N-NO ₃	9,8	4,8	Atende
N-NH ₄	959,6	636,9	Depende da classe da água

A avaliação e monitoramento do pH em reatores anaeróbios é de extrema importância, uma vez que os microrganismos metanogênicos são os mais sensíveis às variações de pH. O pH é um fator importante no crescimento das bactérias, sendo que a maioria delas não tolera pH acima de 9,5 ou abaixo de 4,0. Metcalf e Eddy (1991) citam a faixa ótima de pH para o crescimento de bactérias entre 6,5 e 7,5. No processo anaeróbio, os diferentes grupos de bactérias podem apresentar faixas ótimas de pH com valores diferentes. Por exemplo, os microrganismos produtores de metano têm um crescimento ótimo na faixa de pH entre 6,8 e 7,4, Zehnder et al. (1982). As bactérias produtoras de ácidos graxos voláteis,

produtos gerados durante a decomposição anaeróbia, têm crescimento ótimo na faixa de pH entre 5,0 e 6,0 (Chernicharo e Aroeira, 1994).

O pH, nesse segundo ciclo do experimento, nos reatores que tiveram degradação da matéria orgânica, ou seja aqueles que funcionaram, registrou ligeira alcalinidade, quando se compara com a variabilidade considerada ótima para crescimento bacteriano. Porém, ainda assim, o aumento do pH foi pouco expressivo, não prejudicando o processo. O pH atendeu aos parâmetros exigidos na legislação ambiental vigente.

Os parâmetros N, P, K e DBO₅, tal como ocorrido no primeiro ciclo do experimento, tiveram eficiência média de 50% de remoção desses parâmetros no efluente final. Do mesmo modo, esses parâmetros medidos no efluente pós-tratamento não alcançaram os valores estabelecidos na legislação ambiental vigente no Estado (Deliberação Normativa COPAM 010/86) exigindo, portanto, um tratamento complementar a fim de atender esses requisitos. A eficiência de remoção dos nutrientes foi de: N (38,03%); P (84,48%); K (31,35%) e DBO₅ (52,66%).

O carbono teve uma eficiência em remoção de 85,25%. A formação do metano, seja pela clivagem do ácido acético gerando metano e gás carbônico ou seja pela redução do gás carbônico, em metano e água, houve grande utilização de carbono pelos microrganismos metanogênicos, liberando-o para a atmosfera sob a forma de gases, metano e carbônico, reduzindo sua concentração no efluente tratado.

Os micronutrientes cobre e zinco tiveram uma eficiência de remoção de 70,58% e 80,19%, respectivamente, confirmando a eficiência dos reatores na redução desses micronutrientes. Porém, nessa repetição do

experimento, embora tenha havido grande redução da concentração do micronutriente cobre, essa ainda não foi suficiente para o atendimento à legislação ambiental vigente. Outro elemento importante em ser analisado, foi o sódio que teve uma redução insignificante, cerca de 11,3%. Esse elemento é importante, caso haja disposição em solo do efluente, pois, com o tempo, poderá ocasionar salinização do solo. Fator esse, importante para ser analisado, e até mesmo caso a disposição final seja em corpo d'água cuja vazão seja pequena, podendo ocasionar morte de alguns organismos aquáticos mais sensíveis.

4.4 Análise qualitativa dos gases

Mistura de gás padrão:

Hidrogênio: 2,015% mol/mol;
 Gás carbônico: 25,0% mol/mol;
 Gás metano: 47% mol/mol;
 Monóxido de Carbono: 0,514% mol/mol;
 Nitrogênio: 25,4710% mol/mol.

A análise dos gases foi realizada a partir da coleta dos gases produzidos nos reatores anaeróbios que funcionaram, onde analisou-se a quantidade de metano e gás carbônico produzido.

Tabela 4: Resultados das coletas realizadas nos reatores em funcionamento (1, 2 e 3), no segundo ciclo.

Amostra	Metano (%)	Gás carbônico (%)
17/01/05	47,99	24,94
31/01/05	48,45	25,12
14/02/05	63,47	30,70
28/02/05	71,28	24,91
14/03/05	66,37	30,50
28/03/05	45,43	54,41

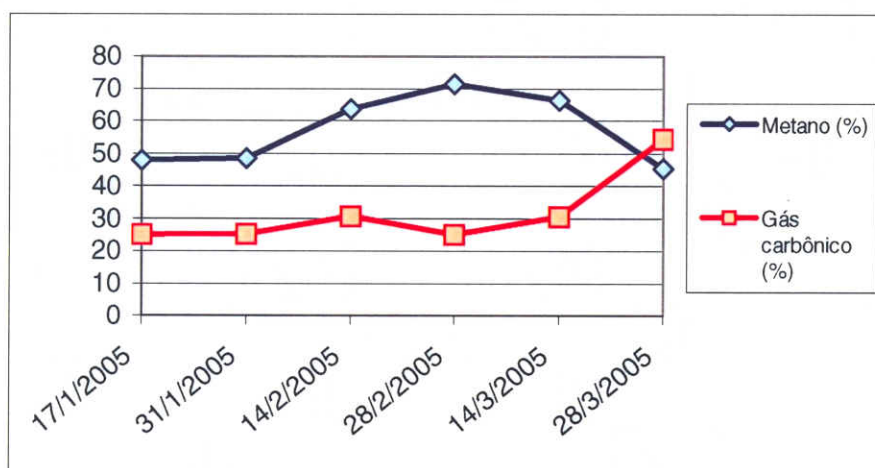


Figura 5: Resultados das coletas de gases realizadas nos reatores em funcionamento (1,2,3), durante o segundo ciclo do experimento.

Os ácidos voláteis mais importantes para a formação do metano são o acético e o propiônico. O ácido propiônico resulta, principalmente, da fermentação dos carboidratos e proteínas presentes, sendo que cerca de 30% do composto orgânico é convertido nesse ácido, antes que seja convertido em metano.

O ácido acético é o ácido intermediário mais abundante, sendo formado praticamente a partir de todos compostos orgânicos. Esse ácido é precursor de cerca de 72% do metano formado e, juntamente com o ácido propiônico, de cerca de 85% da formação do metano.

Desse modo, há dois mecanismos básicos de formação de metano, e, ao ser analisado o gráfico anterior, entende-se porque a curva de produção de metano cresce à medida que há decréscimo na formação de gás carbônico, até atingir o limiar de produção de metano, quando a situação, então, se inverte. O primeiro mecanismo de produção de metano se dá a partir da clivagem do ácido acético, que, conforme comentado anteriormente, está em altas concentrações no efluente, por ação das bactérias acetogênicas e fermentativas (início da degradação da matéria orgânica). Nesse momento, há aumento na produção de gás metano e certa produção de gás

carbônico, resultante da clivagem do ácido acético, conduzindo à formação de metano e gás carbônico ($C^*H_3COOH \rightarrow C^*H_4 + CO_2$). O grupo metil do ácido acético é reduzido a metano, enquanto o grupo carboxílico é oxidado a gás carbônico, realizado pelos microrganismos metanogênicos acetoclásticos. Nesse momento, há incremento na produção dos dois gases, resultantes da clivagem do ácido acético.

Após a data de 14/02/05, observou-se aumento contínuo na produção de gás metano e queda na produção de gás carbônico. Isso se dá pela ação dos microrganismos hidrogenotróficos, os quais, na presença de hidrogênio livre, formarão metano a partir desse hidrogênio. O CO_2 presente atua como acceptor dos átomos de hidrogênio removidos dos compostos orgânicos pelas enzimas (redução da concentração de CO_2 no meio). Uma vez que o gás carbônico encontra-se sempre presente em excesso em um reator anaeróbio, sua redução a metano não é fator limitante no processo. Assim, a formação de metano se dá pelo seguinte mecanismo: $CO_2 + 4H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$. Desse modo, explica-se porque há crescente produção de metano e decréscimo na liberação de gás carbônico.

Além disso, deve ser ressaltado que o metano produzido no processo de digestão anaeróbia é rapidamente separado da fase líquida, devido a sua baixa solubilidade em água, resultando em elevado grau de degradação dos despejos líquidos, uma vez que este gás deixa o reator na fase gasosa. O dióxido de carbono, ao contrário, é bem mais solúvel em água que o metano, saindo do reator parcialmente como gás e parcialmente dissolvido no efluente líquido. Desse modo, há acréscimo na curva do CO₂, após a degradação da matéria orgânica, devido ao seu despreendimento ser mais lento.

4.4 Análise quantitativa dos gases

A análise quantitativa dos gases foi avaliada através do medidor de fluxo de gases e através dos gasômetros construídos em garrafas Pet's e em PVC. Avaliou-se a quantidade de gás produzidos por dia e acumulado no período do experimento, a fim de conhecermos a quantidade de gás que é produzido no sistema anaeróbio. A finalidade de se conhecer é possibilitar a utilização desse gás para fornecimento de energia.

Tabela 5: Análise quantitativa da produção de gases no primeiro ciclo do experimento.

Data	Deslocamento matinal (mL)	Deslocamento à tarde (mL)	Temp. Mín. °C	Temp. Máx. °C	Deslocamento acumulado (mL)
12/nov	1.767,8	1.767,8	21,5	32,2	3.535,6
16/nov	1.767,8	1.767,8	19,2	26,6	7.071,2
17/nov	839,2	839,2	20,1	30	8.749,6
18/nov	-	1.532,1	19,4	29,7	10.281,7
19/nov	1.532,1	2.003,5	19,6	28,5	13.817,3
20/nov	2.828,5	-	19,4	29,2	16.645,8
26/nov	4.242,8	3.653,5	17,6	32,5	24.542,1
29/nov	4.242,8	825,0	20,2	29,6	29.609,9
30/nov	1.532,1	707,1	19,9	25,8	31.849,1
1/dez	2.475,0	825,0	18,7	24,8	35.149,1
2/dez	3.653,5	4.242,8	18	25,8	43.045,4
3/dez	7.049,9	1.532,1	17,7	26,3	51.627,4
6/dez	7.049,9	4.360,6	19,4	30,6	63.037,9
7/dez	-	1.532,1	19,6	31,6	64.570,0
8/dez	-	2.710,7	18,7	29	67.280,7
14/dez	3.771,4	-	20	30	71.052,1
15/dez	942,8	1.532,1	19,3	28,1	73.527,0
16/dez	2.239,5	2.592,8	19,4	29,1	78.359,3
17/dez	2.828,5	3.300,0	17,4	28,6	84.487,8
20/dez	2.239,5	-	19,9	25,4	86.727,3
21/dez	942,8	-	19,2	28	87.670,1
23/dez	839,2	-	18,3	24,6	88.509,3
27/dez	2.121,4	2.003,5	20,7	31,4	92.634,2
28/dez	2.121,4	707,1	17,6	32,2	95.462,7
29/dez	1.414,3	-	18,7	29,6	96.877,0
4/jan	-	1.650,0	19,8	28	98.527,0
5/jan	-	-	18,3	27,3	98.527,0
6/jan	1.414,3	-	19,4	28	99.941,3
7/jan	-	-	19,4	29,1	99.941,3
Total	59.856,50	40.084,80	-	-	99.941,30

(-): valor não determinado

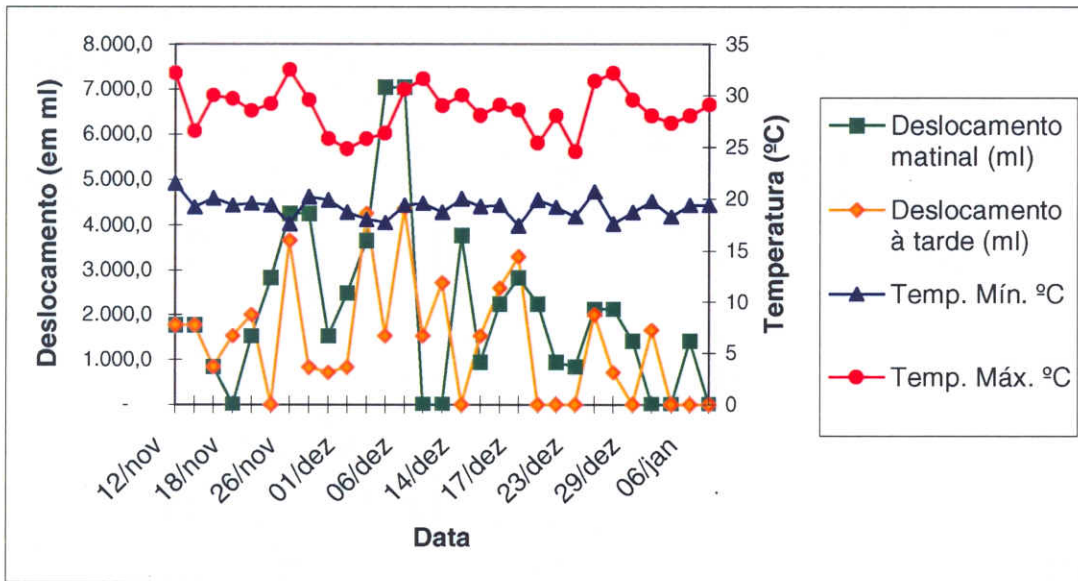


Figura 6: Análise quantitativa da produção de gases no primeiro ciclo do experimento.

A média da temperatura máxima registrada no CNPMS, no período em que se desenvolveu o primeiro ciclo do experimento, compreendido entre 12 de novembro de 2004 e 07 de janeiro de 2005, foi de 28,6°C e da temperatura mínima, de 19,1°C. O desvio-padrão da temperatura máxima foi 2,2°C e da temperatura mínima foi de 0,9°C. A correlação entre a temperatura ambiente e a produção de

biogás pelos reatores foi de 0,21, demonstrando baixa correlação entre esses parâmetros.

Medida a produção de biogás no medidor de fluxo, cada centímetro deslocado no gasômetro correspondeu a 235,71 ml de biogás produzido. A quantidade total de gás produzido foi pela manhã de **59.856,50 ml** e à tarde **40.084,80 ml**.

Tabela 6: Análise quantitativa dos gases no segundo ciclo do experimento

Data	Deslocamento matinal (ml)	Deslocamento à tarde (ml)	Temperatura Mín. (°C)	Temperatura Máx. (°C)	Deslocamento acumulado (ml)
11/jan	2.100,0	2.100,0	19,8	30,8	4.200,0
18/jan	787,5	-	20,8	29,9	4.987,5
19/jan	2.887,5	1.837,5	19,5	28,4	9.712,5
24/jan	4.987,5	-	20,5	33,2	14.700,0
25/jan	4.462,5	4.068,8	19,8	31,6	23.231,3
26/jan	4.593,8	-	19,6	30,8	27.825,1
27/jan	1.443,8	-	19,4	31,6	29.268,9
31/jan	2.493,8	-	19,3	29,2	31.762,7
1/fev	3.937,5	1.181,3	19,6	26,2	36.881,5
2/fev	1.837,5	1.837,5	17,2	23,1	40.556,5
3/fev	-	2.625,0	18,5	21,0	43.181,5
4/fev	-	2.100,0	18,2	21,3	45.281,5
15/fev	-	3.281,3	18,1	32,0	48.562,8
16/fev	2.887,5	3.281,3	19,6	31,4	54.731,6
17/fev	3.018,8	2.625,0	20,0	32,5	60.375,4
18/fev	2.362,5	1.706,3	20,1	29,9	64.444,2
21/fev	-	-	18,6	31,6	64.444,2
23/fev	-	-	16,6	32,0	64.444,2
24/fev	-	-	18,2	33,2	64.444,2
25/fev	3.150,0	-	19,1	31,6	67.594,2
28/fev	-	-	19,0	27,3	67.594,2
1/mar	-	787,5	20,0	26,2	68.381,7
2/mar	3.281,3	-	19,9	23,1	71.663,0
3/mar	4.987,5	-	17,4	21,0	76.650,5
4/mar	3.806,3	-	18,2	21,3	80.456,8
7/mar	-	2.100,0	18,3	30,7	82.556,8
8/mar	-	3.675,0	19,2	31,0	86.231,8
9/mar	2.100,0	-	19,6	31,4	88.331,8
10/mar	2.625,0	-	18,6	29,5	90.956,8
14/mar	-	1.968,3	19,1	29,0	92.925,1
15/mar	3.281,3	-	20,2	30,3	96.206,4
16/mar	3.150,0	2.756,3	18,6	27,3	102.112,7
17/mar	3.281,3	3.281,3	18,3	23,6	108.675,3
21/mar	-	-	17,7	19,0	108.675,3
22/mar	-	2.887,5	18,0	23,2	111.562,8
23/mar	2.887,5	-	17,4	20,0	114.450,3
24/mar	-	2.887,5	19,0	26,7	117.337,8
TOTAL	70.350,40	46.987,40			117.337,80

(-): valor não determinado.

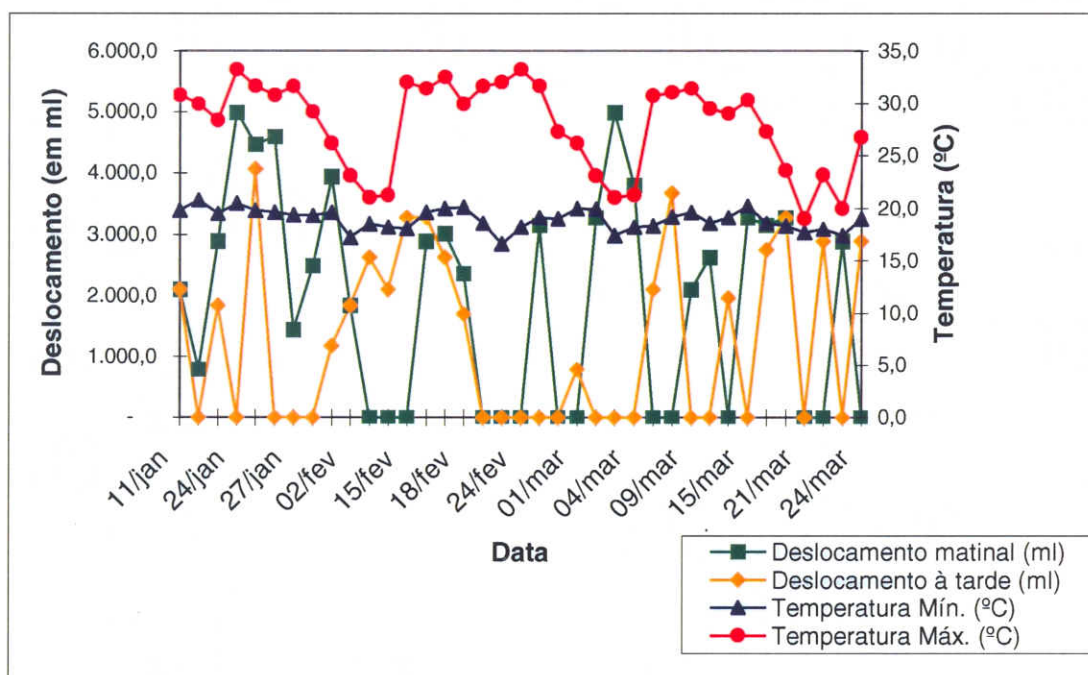


Figura 7: Análise quantitativa dos gases no segundo ciclo do experimento

A média da temperatura máxima registrada no CNPMS, no período compreendido entre 11 de janeiro de 2005 e 24 de março de 2005, período em que se desenvolveu o segundo ciclo do experimento, foi de 26,6°C e da temperatura mínima, de 18,7°C. O desvio-padrão da temperatura máxima foi 4,67°C e da temperatura mínima foi de 0,9°C. A correlação entre a temperatura ambiente e a produção de biogás pelos reatores foi de 0,39, demonstrando fraca correlação entre esses parâmetros, tal como já fora observado no primeiro ciclo.

A produção do biogás foi medida utilizando-se o medidor de fluxo, também, e a cada centímetro do gasômetro que foi deslocado, corresponde a 262,5 mL de biogás produzido. O volume total de gás produzido

foram pela manhã de **70.350,4 mL** e à tarde **46.987,4 mL**.

4.5 Análise da contagem da população microbiana em dejetos de suíno

Apesar de haver testes para crescimentos de fungos e actinomicetos, não foram observados crescimento em nenhuma placa, para esses microrganismos. Houve um aumento quantitativo da microbiota bacteriana, se comparado o afluente com as amostras coletadas nos reatores. Houve, também, um aumento na diversidade bacteriana, que será discutido. A seguir, a tabela 7 demonstra os valores quantitativos da população bacteriana presente no afluente e nos reatores.

Tabela 7: População e bactérias presentes nos efluentes dos reatores no segundo ciclo do experimento.

Amostras	Meio de Cultura	UFC mL ⁻¹
1 (reatores 1, 2 e 3)	BDA	2,85 x 10 ⁴
2 (reatores 4, 5 e 6)	BDA	6,0 x 10 ³
3 (reatores 7, 8 e 9)	BDA	8,7 x 10 ⁴
4 (afluente)	BDA	3,55 x 10 ⁶

Foi observada alteração da biodiversidade microbiana, quando comparadas as amostras coletadas no afluente (amostra 4) e no efluente oriundo dos reatores em que houve degradação da matéria orgânica (que funcionaram) - reatores 1, 2 e 3 (amostra 1), e naqueles reatores que não degradaram a matéria orgânica, reatores 4, 5 e 6 (amostra 2) e reatores 7, 8 e 9 (amostra 3). Pode-se

observar, na tabela anterior, que nas amostras obtidas no afluente houve crescimento bacteriano com maior número de colônias, porém com menor biodiversidade (ver figuras seguintes). O maior número de colônias é esperado, uma vez que podem estar presentes bactérias de origem intestinal, ambiental, etc.

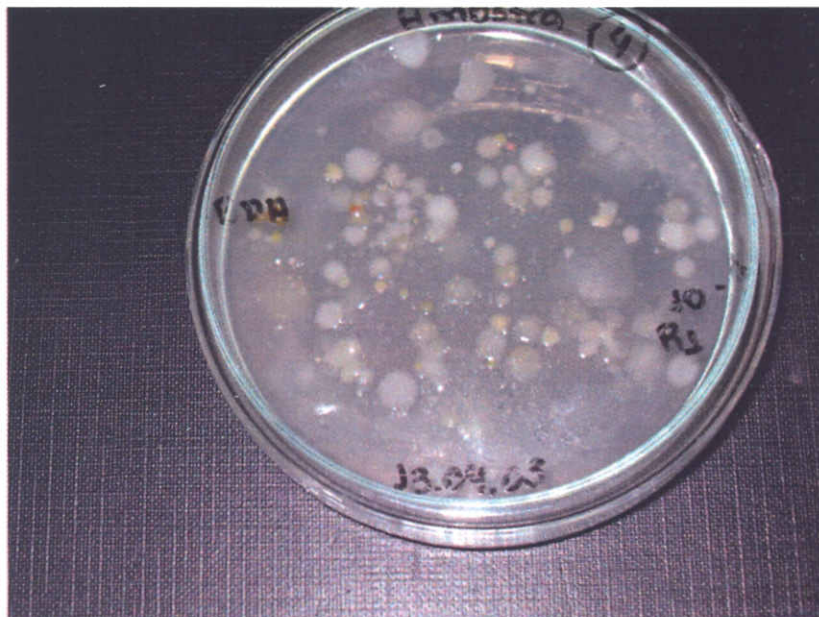


Figura 8: Foto da amostra retirada do afluente, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-3} .

Quando são comparadas as amostras retiradas dos reatores 1, 2 e 3, que foram eficientes na degradação da matéria orgânica, com as amostras obtidas do afluente, observa-se que houve aumento na diversidade das colônias, conforme mostram as figuras seguintes. Até nas amostras obtidas dos reatores em que não houve degradação da matéria orgânica, pode-se observar a presença de colônias semelhantes, porém com decréscimo acentuado das UFC.

Pode-se concluir que por os efluentes estarem em anaerobiose foi um fator relevante para a alteração da biodiversidade dos efluentes, com a morte das bactérias aeróbias e o predomínio de microbiota estritamente anaeróbia, com a possibilidade de haver alguns microrganismos facultativos. A presença de nutrientes essenciais ao crescimento bacteriano (N, P, K) garantiu o desenvolvimento dessa biota variada.

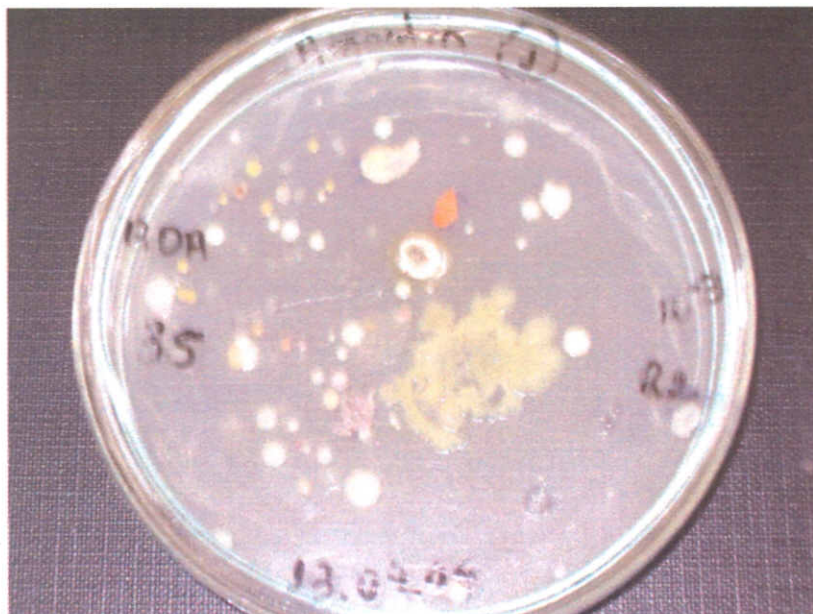


Figura 9: Foto da amostra composta dos efluentes dos reatores 1, 2 e 3, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-3} .



Figura 10: Foto da amostra composta dos efluentes dos reatores 4, 5 e 6, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-3} .

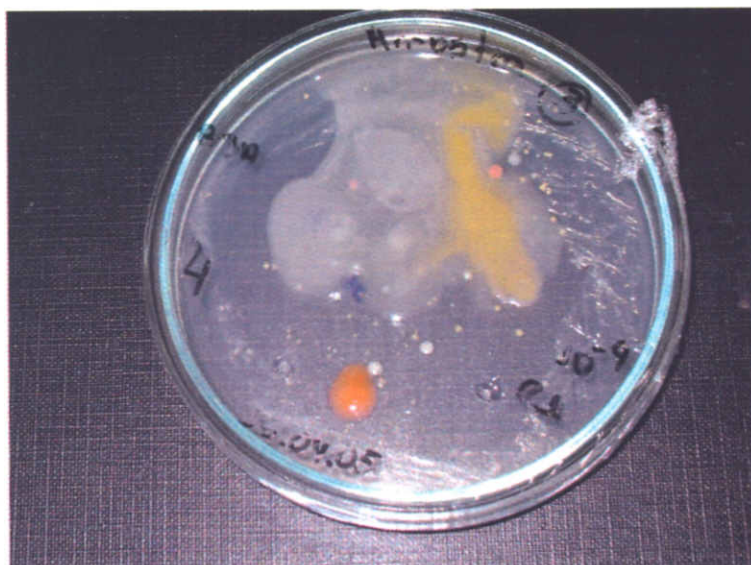


Figura 11: Foto da amostra composta do efluente dos reatores 7, 8 e 9, segundo ciclo do experimento, em diluição 10^{-4} .

4.6 Diversidade genética da população de bactérias e de *Archaea* por meio de eletroforese em gel de gradiente (DGGE)

A técnica do DGGE vem sendo utilizada para a análise de comunidades de bactérias em ambientes naturais, inclusive no monitoramento de mudanças das estruturas dessas comunidades em função de fatores de poluição. Mas é importante considerar algumas limitações, quando ela é empregada em estudos da ecologia de microrganismos (Muyser e Smalla, 1998).

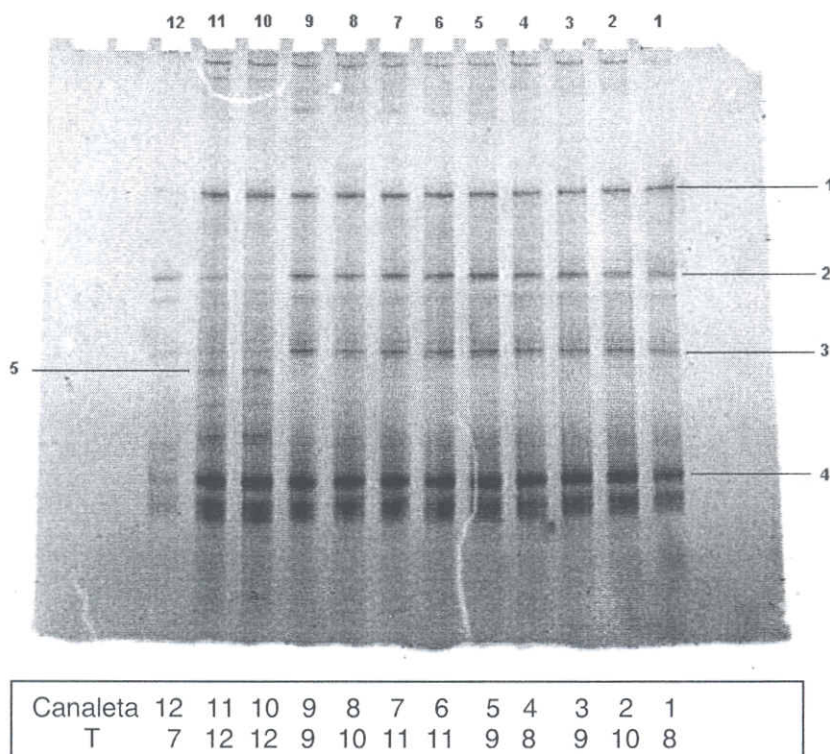
Normalmente, considera-se cada banda do gel, após o DGGE, como representando uma espécie microbiana. Uma limitação da técnica é a amplificação preferencial de algumas sub-populações dentro da comunidade microbiana complexa, durante o PCR, de modo que as bandas observadas representem apenas as espécies mais abundantes na amostra.

O domínio *Archaea* engloba microrganismos que se desenvolvem em ambientes específicos, incluindo aqueles com altas temperaturas e salinidade, extremos de pH e ausência de oxigênio, sendo dividido em três grupos: *Crenarchaeota*, *Euriarchaeota* e

Korarchaeota. O grupo *Euriarchaeota* é considerado o grupo mais diversificado fisiologicamente incluindo os microrganismos metanogênicos, objeto desse estudo, que crescem em nichos estritamente anaeróbios, além dos halófilos e termófilos.

Os padrões de amplificação via PCR de rDNA 16S extraído de amostras dos nove biodigestores, duas amostras do afluente e uma amostra composta dos reatores que funcionaram no primeiro ciclo do experimento (reatores 1 e 2), combinado com a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) estão apresentados na figura 12.

Os perfis gerados apresentaram-se especialmente polimórficos quando comparados aos obtidos para as amostras dos reatores anaeróbios, as amostras dos afluentes e a amostra dos reatores que funcionaram no primeiro ciclo do experimento. Porém, observaram-se diferenças na presença e intensidade de algumas bandas entre os reatores, as amostras do afluente e a amostra dos reatores que funcionaram no primeiro ciclo. (Figura 12).



Legenda: ■ presença de banda; □ ausência de banda. T: número de bandas presentes na amostra em relação à porcentagem de bandas encontrada em cada domínio.

Figura 12: Foto do DGGE de bactérias com os primers R1401 x F968GC universais para bactérias

Os padrões de bandeamento encontrados com o emprego de DGGE em outros estudos comparativos entre o afluente, efluente tratado e efluente não-tratado, que contêm comunidades microbianas com alta diversidade, são muito complexos. O número e a ocorrência das bandas podem ser utilizadas para a comparação entre as comunidades contidas em diferentes amostras, por meio de agrupamento hierárquico. As análises realizadas no presente estudo mostram que o padrão de bandeamento dos amplicons do rDNA 16S de microrganismos do domínio *Eubacteria* se agrupam em função do fator ponto de coleta da amostra, indicando condicionamento da estrutura da comunidade bacteriana em função da localização da coleta. O mesmo não ocorreu com o domínio *Archaea* (Figura 13), que mostra agrupamento preferencial pela

degradação ou não da matéria orgânica, indicando condicionamento da comunidade microbiana em função de fatores mais sensíveis, quando comparadas às comunidades bacterianas.

As setas 1, 2, 3, 4 e 5, da Figura 12, correspondem às bandas cortadas do gel que foram seqüenciadas. Os microrganismos encontrados tiveram homologia média de 92,2% com os seguintes microrganismos:

Banda 1: gi|437762|emb|X73448.1|CP16SRND *Clostridium proteolyticum* (97% de homologia).

Banda 2: gi|29653053|gb|AY244773.1| *Clostridium glycolicum*. (94% de homologia).

Banda 3: gi|28864688|gb|AY208919.1| *Clostridium fallax*. (93% de homologia).

Banda 4: gi|28864688|gb|AY208919.1| *Clostridium fallax*. (85% de homologia).

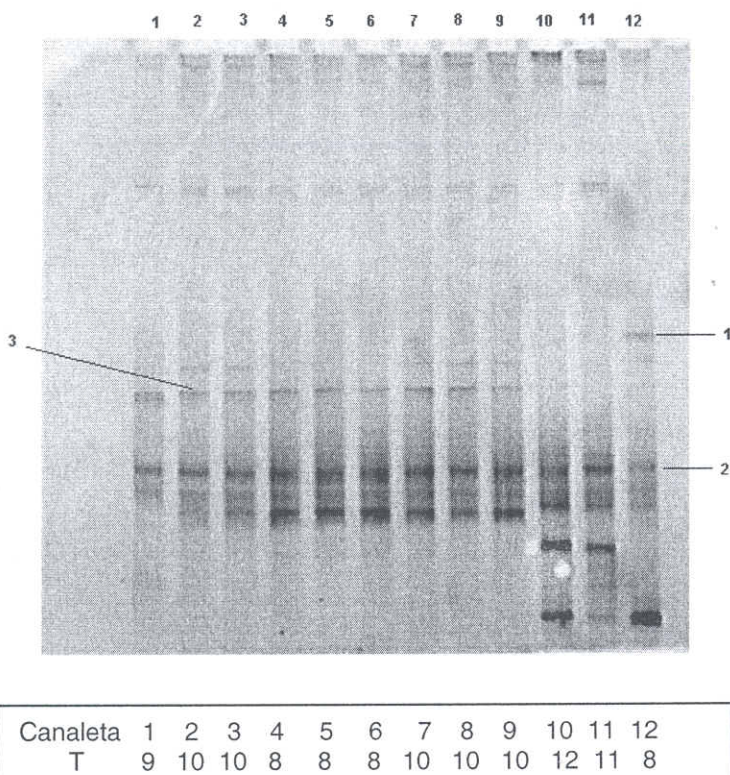
Banda 5: [gi|6066689|emb|AJ241742.1|SGO241742](#) *Streptococcus gordonii*. (92% de homologia).

Conforme já foi mencionado no capítulo da metodologia, as amostras 10 e 11 representam as amostras obtidas no afluente. As demais amostras foram obtidas nos reatores de 1 a 9 do segundo ciclo do experimento e a amostra 12 foi obtida de amostra composta dos reatores 1 e 2 (reatores que funcionaram no primeiro ciclo do experimento). A riqueza de espécies do domínio *Eubacteria* foi menos influenciada pelo funcionamento ou não dos biodigestores do que as espécies do domínio *Archaea*. Houve diferenciação da biodiversidade bacteriana quando comparadas as amostras obtidas do afluente com relação às amostras obtidas dos reatores.

Essa diferenciação pode ter ocorrido pela anaerobiose dos biodigestores. As amostras

obtidas do afluente possuem bactérias ambientais, entéricas, aeróbias e facultativas, isso pode ser a causa do aparecimento de bandas que não foram detectadas nas demais amostras.

Pryde et al. (1999), analisaram, por meio de análise molecular, a diversidade microbiana presente na parede do cólon, do lúmen do cólon, e lúmen do ceco de suínos, em criações no Reino Unido, a partir de culturas isoladas anaerobicamente. Foram identificados 6 gêneros, sendo os mais representativos da flora intestinal de suínos, sendo estes: *Streptococcus* sp.; *Lactobacillus* sp.; *Streptococcus* sp.; *Ruminococcus* sp.; *Clostridium* sp. e *Selenomonas* sp. As espécies encontradas nesse trabalho tiveram homologia com os microrganismos descritos como usualmente presentes no trato intestinal dos suínos, representando as bactérias anaeróbias entéricas.



Legenda: ■ presença de banda; □ ausência de banda. T: número de bandas presentes na amostra em relação à porcentagem de bandas encontrada em cada domínio.

Figura 13: Foto do DGGE com os primers específicos de *Archaea*.

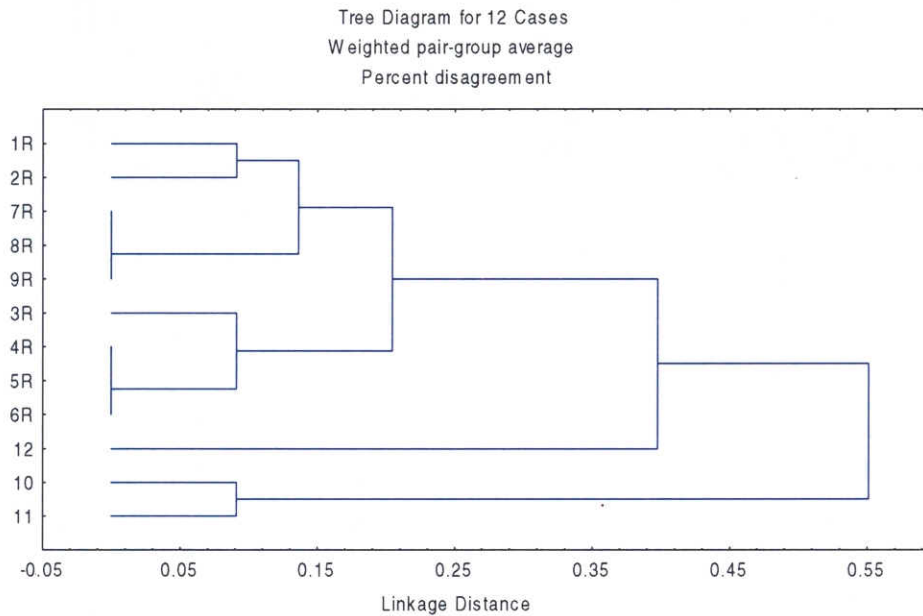


Figura 14: Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de *Archaea* de efluentes de suinocultura, detectadas por DGGE.

Para se fazer o gel de *Archaea*, foi utilizado, primeiramente, o par AR4F x UNI1492 e depois, R1401 x F968GC. As bandas foram cortadas das amostras 2, 3 e 4, conforme ilustra a figura 14. Essas bandas não revelaram sequências de microrganismos conhecidos por não terem sido ainda identificados e algumas bandas revelaram a presença de microrganismos não cultiváveis em laboratório e, também, ainda não identificados.

Há aumento da diversidade de *Archaea*, quando comparados os valores de contagem das amostras 10 e 11 (afluente) com os demais obtidos nas amostras (amostras obtidas de reatores anaeróbios). A alteração da biodiversidade quando comparado o afluente ao efluente obtido de reatores foi presenciada tanto no DGGE de bactérias quanto de *Archaea*, podendo-se concluir que predomina uma microbiota essencialmente anaeróbia, nos reatores. Já no afluente estão presentes microrganismos aeróbios e facultativos.

Dentre o grupo das amostras obtidas dos biodigestores, houve diferenciação da diversidade de *Archaea* quando comparadas as amostras 12 e as amostras obtidas dos demais reatores (1 a 9). A amostra 12 foi obtida de uma amostra composta dos reatores 1 e 2 que funcionaram no primeiro ciclo do experimento, em contraponto, as demais amostras foram obtidas dos reatores de 1 a 9 montados no segundo ciclo do experimento. Pode-se inferir que, há variação na diversidade de *Archaea* encontrada no primeiro ciclo do experimento quando comparada à observada no segundo ciclo, por ocasião da alteração de manejo que ocorre normalmente em granjas suinícolas. Em granjas, há, freqüentemente, mudanças na alimentação, seja em proporção de alimentos fornecidos, insumos, probióticos, promotores de crescimento, antibióticos, etc. Também houve interferência por alteração climática (temperatura, umidade) quando comparados por espaço temporal esses dois ciclos experimentais, contribuindo para essa alteração da diversidade de *Archaea*

encontrada. A alteração da microbiota presente no trato intestinal de suínos foi comprovada por Pryde et al.(1999).

Pode-se notar diversificação das comunidades de *Archaea*, quando comparados os valores de contagem obtidos nos reatores 3, 4, 5 e 6, em relação aos valores obtidos nos reatores 1, 2, 7, 8 e 9. Houve diferenciação ainda maior dentro desses dois grupos, se comparada a amostra 3 diferenciando-se das amostras 4, 5, 6 e amostras 1 e 2 em relação às amostras 7, 8 e 9.

Conforme já foi comentado anteriormente, os reatores que funcionaram no segundo ciclo do experimento, objetos desta avaliação, foram os reatores 1, 2 e 3. Houve uma diferenciação dos reatores 1 e 2 em relação ao seu grupo 7, 8 e 9, e essa diferenciação ocorreu pelo ambiente favorável ao desenvolvimento das *Archaea* metanogênicas, ou seja, aos microrganismos responsáveis pela degradação final da matéria orgânica, convertendo os ácidos orgânicos em metano e gás carbônico nesses dois reatores (1 e 2). Já os reatores 7, 8 e 9, não funcionaram dentro do ciclo analisado, de 75 dias. Esses biodigestores não receberam a adição de qualquer tipo de inóculo, sendo seu conteúdo formado apenas pelo afluente da suinocultura.

Com relação à diferenciação das comunidades de *Archaea* dentre o grupo dos reatores 3 e 4, 5 e 6 é referente ao funcionamento do reator 3 e ao não funcionamento dos reatores 4, 5 e 6. Esses últimos reatores tiveram a inoculação de esterco bovino com o inóculo, diferindo das demais amostras por apresentar uma composição com um diferencial de sua biodiversidade. Já o reator 3, como os reatores 1 e 2, apresentou um ambiente favorável ao desenvolvimento de uma biodiversidade capaz de degradar a matéria orgânica presente no afluente.

Relativamente à diferenciação da diversidade de *Archaea* dentre o grupo de reatores que funcionaram no segundo ciclo do experimento, reatores 1 e 2, do reator 3,

não pôde ser avaliada nesse trabalho. Haveria necessidade de um monitoramento freqüente dos atributos físicos, químicos e bioquímicos do líquido contido nos reatores, durante o ciclo observado, e analisar se a alteração de algum desses parâmetros favoreceu ou prejudicou alguma espécie de *Archaea*, possibilitando uma modificação na biodiversidade final do efluente.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados no capítulo anterior, obtidos nos ciclos experimentais desta pesquisa, chegou-se às seguintes conclusões:

✓ O reator anaeróbio em batelada manteve-se em equilíbrio durante os ciclos do experimento, o que se verificou pelos resultados das análises físicas, químicas e biológicas do afluente e do efluente retirado dos reatores que funcionaram, apresentando efluente de qualidade semelhante à obtida em reatores anaeróbios mais modernos (reatores *UASB*, p. ex.);

✓ Os reatores anaeróbios em batelada podem ser utilizados para tratamento de dejetos de suínos. Porém, para que sua eficiência atinja os padrões de tratamento exigidos na legislação ambiental, faz-se necessário a implantação de tratamentos complementares, como a realização de tratamento primário anterior (separação das frações sólida e líquida) e de pós-tratamento dos efluentes dos reatores (p.ex., lagoa de polimento);

✓ Os valores encontrados indicaram a remoção satisfatória de alguns nutrientes, como exemplo a remoção do fósforo, que é fator limitante no processo de eutrofização dos corpos d'água;

✓ Houve, também, a remoção de micronutrientes, destacando-se o cobre e o zinco, elementos estes presentes em maior quantidade em efluentes de suinocultura. O cobre, principalmente, tem efeito tóxico para peixes;

✓ O uso de inóculo nos reatores anaeróbios em batelada antecipa o pico de produção de gás e, conseqüentemente, reduz o tempo de detenção hidráulica. A quantidade de inóculo a ser adicionada é

diretamente proporcional à carga orgânica do afluente a ser tratado. É necessário que haja compatibilidade entre as características do substrato e as do inóculo;

✓ Houve aumento na biodiversidade, quando comparado o afluente com os efluentes dos reatores, o que indicaria a alteração da biota nos efluentes, passando de biota aeróbia e/ou facultativa para biota anaeróbia. Esses microrganismos foram os responsáveis pela degradação da matéria orgânica. Há necessidade de se estudar isoladamente as colônias que cresceram nas placas;

✓ As comunidades bacterianas tiveram homologia com microrganismos comumente presentes na flora intestinal de suínos, sendo mais representativa a diversidade no afluente do que no efluente de reatores;

✓ As comunidades de *Archaea* sofreram maior alteração, comparando-se os reatores tratados, não tratados e o afluente, quando comparada às comunidades bacterianas;

✓ Não foi possível a identificação dos microrganismos do domínio *Archaea* por não estarem catalogados até o momento da pesquisa;

✓ Os efluentes advindos de suinocultura apresentam grande diversidade genética de microrganismos dos domínios *Eubacteria* e *Archaea*, sendo importante a continuidade dos estudos, a fim de se avaliarem as interferências ambientais na biodiversidade nos biodigestores anaeróbios para tratamento desses efluentes.

Portanto, o presente estudo teve como objetivos a avaliação da eficiência de fermentação e a diversidade microbiana de reatores de batelada, no tratamento de águas residuárias de suinocultura, com o isolamento de *Archaea* metanogênicas, microrganismos estes que participam ativamente do processo de degradação de matéria orgânica presente em efluentes de suinocultura.

Na realização deste trabalho, levou-se em consideração as granjas, para as quais haja escassez de espaço físico e, por isso, a implantação de um sistema de tratamento de efluentes através de lagoas de

estabilização torna-se difícil. Também, as granjas em que a carga orgânica presente nos efluentes seja muito alta, seja devido à criação de um plantel grande ou em granjas de terminação de animais, em que, pela grande quantidade de efluente a ser tratada e por sua carga orgânica elevada, levaria à construção de lagoas de estabilização com extensas áreas. Portanto, buscou-se, assim, avaliar uma alternativa de tratamento de efluentes para essas granjas suinícolas.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BLEY JÚNIOR, C. Instalações para o tratamento de dejetos. In: Ciclo de palestras de dejetos de suínos, manejo e utilização do sudoeste goiano, 1, 1997, Rio Verde. **Anais...**Rio Verde: Fundação do Ensino Superior de Rio Verde, ESUCARV. 1997. p 48 – 68.

CAMPOS, S.C.B. **Digestão anaeróbica da vinhaça sob condições operacionais de elevada acidez e baixa alcalinidade.** 1987.111f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomicas – Universidade Estadual Paulista.

CHERNICHARO, C.A.L.; AROEIRA, R.M. Metodologia para avaliação de alcalinidade em processos anaeróbios. **Revista BIO**, v.23, n11.,p.31-36, 1994.

CHERNICHARO, C. A. L., **Reatores Anaeróbios.** Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFMG,. (Princípios do Tratamento Biológico de Águas Residuárias; v. 5). 1997.247 p.

RESOLUÇÃO CONAMA, n. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação das águas doces no Brasil e define os padrões de lançamento de efluentes nos corpos hídricos. Disponível em: www.mma.gov.br, acesso em 01 de fevereiro de 2005.

DELIBERAÇÃO Normativa, n.010, de 16 de dezembro de 1986. Estabelece normas e padrões para qualidade das águas, lançamento de efluentes nas coleções de águas, e dá outras providências. Disponível em: www.feam.br, acesso em dia 01 de fevereiro de 2005.

<http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>. Site de descrição de espécies de *Archaea*, com validade na literatura internacional.

FERREIRA, A. S.; SILVA, F.C.O. Dejetos de suínos na alimentação de monogástricos. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE DEJETOS DE SUÍNOS, MANEJO E UTILIZAÇÃO NO SUDOESTE GOIANO, 1, 1997, Rio Verde. **Anais...**Rio Verde: ESUCARV. 1997. p 81 - 96.

FIALHO, E.T et al. **Manejo da dieta para reduzir o impacto ambiental dos dejetos de suínos**. Cad. Téc. Vet. Zootec., n.42, p.87 - 1-2, 2003.

FUHRMAN, J.A; DAVIS, A. Widespread *Archaea* and novel bacteria from the deep sea as shown by 16rRNA gene sequences. **Mar Ecol. Prog. Ser.** v.150, p.275-283. 1997.

KONZEN, E. A. Valorização agrônômica dos dejetos de suínos: utilização de dejetos como fertilizantes. In: CICLO DE PALESTRAS SOBRE DEJETOS DE SUÍNOS, MANEJO E UTILIZAÇÃO NO SUDOESTE GOIANO, 1, 1997, Rio Verde. **Anais...**Rio Verde: ESUCARV. 1997. p 113-137.

LETTINGA G. et al. Use of the upflow sludge blanket (UASB) reactor concept for biological wastewater treatment especially for anaerobic treatment. **Biotechnology and Bioengineering**, v.22, p. 699 - 734, 1980.

LUCAS Jr, J. **Algumas considerações sobre o estrume de suínos, como substrato para três sistemas de biodigestores anaeróbios**. 1994. 137f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista.

MADIGAN, M.T.; MARINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8^a. Ed. New Jersey: Prentice - Hall, 1997, cap. 15., 16. e 17. p. 606 - 768.

MALINA, J.F.B. Design of biological wastewater treatment systems. In: SEMINÁRIOS DE TRANSFERÊNCIAS DE TECNOLOGIA - TRATAMENTO DE ESGOTOS, 1992. **Trabalhos Apresentados...** Rio de Janeiro: ABES / Water Environment Federation. 1992, p. 165-171.

METCALF, M.; EDDY, G. **Wastewater engineering treatment disposal reuse**, 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1991. 1334p.

MUYSER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology**, v.73, p. 27 - 141, 1998.

MUYSER, G; WAAL, E.C. de; UITERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p. 695 - 700. 1993.

MUYZER G; BRINKHOFF T; NUBEL U. et al. **Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1998. 56p.

NASCIMENTO, R.A. **Desempenho de reator anaeróbio de manta de lodo utilizando efluentes líquidos de indústria alimentícia**. 1996. 64f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Engenharia Civil - Departamento de Hidráulica e Saneamento. UNICAMP.

OLIVEIRA, P.A.V. **Manual de manejo e utilização dos dejetos de suínos**. Concórdia: EMBRAPA, CNPSA, 1993. 188p. (EMBRAPA.CNPSA, Documentos, 27).

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. 566p.

PENZ Jr., A.M. O conceito de proteína ideal para monogástricos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, CONGRESSO NACIONAL, 6º. CONGRESSO ESTADUAL DE ZOOTECNIA, 14, 1996, Porto Alegre, **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1996. p. 71 - 75.

PERDOMO, C.C. Uso racional da água no manejo de dejetos de suínos. In: SIMPÓSIO MINEIRO SOBRE MANEJO E UTILIZAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS, 1, 1995, Ponte Nova. **Anais...**Viçosa: EPAMIG. 1995. p 8 - 23.

PRYDE, S.E. *et al.* Molecular analysis of the microbial diversity present in the colonic wall, colonic lumen, and cecal lumen of a pig. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 12., p. 5372 - 5377, 1999.

SCHIRALDI,C.; GIULIANO, M.; DE ROSA, M. Perspectives on biotechnological applications of archaea. **Archaea**. Canada:Heron Publishing-Victoria,v.1, p. 75 - 86. 2002.

SECRETARIA DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Caracterização do rebanho suinícola no estado de Minas Gerais. Disponível em: www.ima.mg.gov.br, em 24 de abril de 2005.

SOUBES, M. Microbiologia de la digestión anaerobia. In: TALLER Y SEMINARIO LATINOAMERICANO TRATAMIENTO ANAEROBIO DE AGUAS RESIDUALES, 3, 1994, Montevideo: Montevideo Graphis Ltda.1994, p.15-28.

STALEY, J.T; HOLT, J.G. (Eds.) **Bergey's manual of systemative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, Co. 1989, v.3, *Archaeobacteria, Cyanobacteria, and the remaining Gram-negatives*.

VAN HAANDEL, A.; LETTINGA, G. **Tratamento anaeróbio de esgotos - um manual para regiões de clima quente**. Campina Grande: Guerreiro e Catunda, 1994. 125p.

VON SPERLING, E. **Qualidade da água**. Brasília, DF: ABEAS, 1997. 59p. (Curso por tutoria à distância. Curso de Gestão de Recursos Hídricos para o Desenvolvimento Sustentado de Projetos Hidroagrícolas. Módulo 5).

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: DESA/UFMG, 1996. 70p.

ZAK, J.C.; WILLIG, M.R.; MOORHEAD, D.L. et al. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. **Soil Biology and Biochemistry**, v.26, p.1101-1108, 1994.

ZHANG, R. H.; SUNG, Y. Y. S.; DAGUE, R. R. Anaerobic Treatment of Swine Waste by the Anaerobic Sequencing Batch Reactor. **Transactions of the ASAE**. v. 40, p. 219-227, 1994.

ZEHNDER, A.J.B.; INGORSSEN, K.;MARTI, T. Microbiology of methane bacteria. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANAEROBIC DIGESTION, 2, 1981, **PROC...** Amsterdam: Elsevier Biomedical Press B. V, 1982. p.45-65.

7 ANEXOS

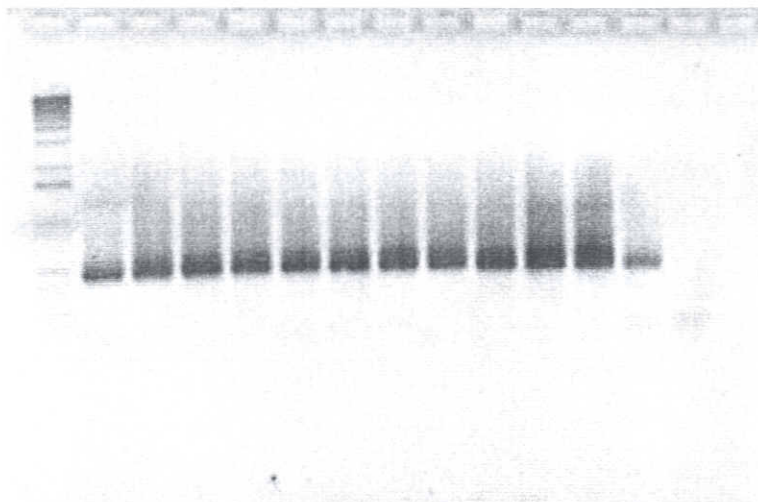


Figura 15: Gel de agarose a 1% para ver a qualidade do DNA de bactéria, após PCR.

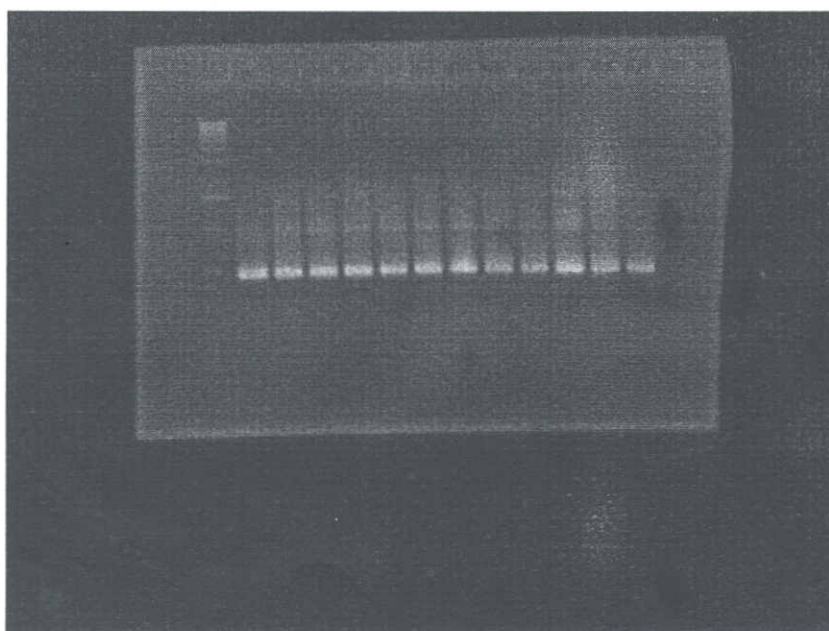


Figura 16: Gel de agarose a 1,5% amostras de DNA diluídas a 30 vezes e amplificadas com primers de bactérias R1401 e F968GC.

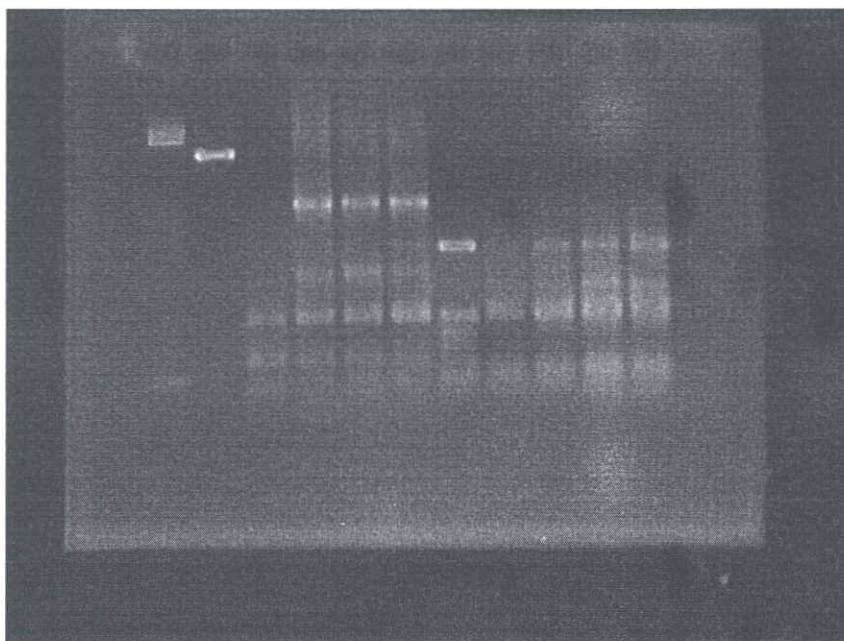


Figura 17: Gel de agarose a 1,5%, DNA amplificado com primers R1401 x F968GC e segunda amplificação com primers AR4F x UNI 1492.

Tabela 8: Matriz da percentagem de distâncias entre os microrganismos analisados a partir do DGGE de *Archaea*. A partir dessa tabela foi elaborado o gráfico inserido no trabalho.

	2R	3R	4R	5R	6R	7R	8R	9R	10	11	12
1R	0,09	0,27	0,36	0,36	0,36	0,18	0,18	0,18	0,64	0,73	0,18
2R		0,18	0,27	0,27	0,27	0,09	0,09	0,09	0,55	0,64	0,27
3R			0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,55	0,64	0,45
4R				0	0	0,18	0,18	0,18	0,45	0,55	0,55
5R					0	0,18	0,18	0,18	0,45	0,55	0,55
6R						0,18	0,18	0,18	0,45	0,55	0,55
7R							0	0	0,64	0,73	0,36
8R								0	0,64	0,73	0,36
9R									0,64	0,73	0,36
10										0,09	0,45
11											0,55