

II-536 - DETERMINAÇÃO DAS ARQUEIAS E DA ATIVIDADE METANOGÊNICA DE LODO PROVENIENTE DE REATOR UASB SEGUIDO DE FILTRO ANAERÓBIO TRATANDO ÁGUAS RESIDUÁRIAS DE SUINOCULTURA

Rose Maria Duda⁽¹⁾

Engenheira Química; Mestre e Doutora em Microbiologia Agropecuária pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal; Pós-doutoranda do Departamento de Eng. Rural da UNESP, Campus de Jaboticabal, Professora Assistente I, da Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal.

Larissa Scattolin Martins⁽²⁾

Doutora em Genética em melhoramento de plantas pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal; Pós-doutoranda do Departamento de Eng. Rural da UNESP, Campus de Jaboticabal.

Roberto Alves de Oliveira⁽³⁾

Engenheiro Agrônomo e Tecnólogo em Construção Civil; Mestre em Agronomia – Produção Vegetal pela UNESP, Câmpus de Jaboticabal; Doutor em Engenharia Civil - Hidráulica e Saneamento pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP); Professor Assistente Doutor, Departamento de Engenharia Rural, UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Endereço^{(1), (3)}: Departamento de Engenharia Rural - Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane - s/n - Jaboticabal/SP - Cep. 14884-900 – Brasil - Tel: (16) 3209-2638 - **e-mail:** oliveira@fcav.unesp.br; roseduda@zipmail.com.br;

RESUMO

Avaliou-se a atividade metanogênica e identificou-se as arqueias presentes do lodo proveniente de um reator UASB e filtro anaeróbio de fluxo ascendente, com volume total de 300 L e 190 L, em série, tratando águas residuárias de suinocultura. Com a utilização de diferentes fontes de substrato no ensaio de atividade da microbiota, observou-se o crescimento equilibrado das populações hidrolíticas, acidogênicas, acetogênicas e metanogênicas acetoclásticas e hidrogenotróficas no lodo dos reatores anaeróbios. Com a aplicação da técnica de biologia molecular (metagenômica) foram identificadas no lodo do reator UASB e do filtro anaeróbio de fluxo ascendente arqueias metanogênicas das famílias *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* e *Methanosaetaceae*.

PALAVRAS-CHAVE: digestão anaeróbia, Filogenia das arqueias, lodo anaeróbio.

INTRODUÇÃO

Segundo a Pesquisa Agropecuária Municipal, o plantel brasileiro de suínos é estimado em 36 milhões de cabeças (IBGE, 2008) com equivalente populacional médio, em termos de demanda bioquímica de oxigênio (DBO_{5,20}), de 3,5 habitantes por suíno (Miranda, 2005).

A digestão anaeróbia é uma solução de baixo custo para o tratamento de águas residuárias com elevadas cargas orgânicas como as provenientes da suinocultura, com as vantagens da produção de biogás e da baixa produção de lodo (Ndon e Dague, 1997; Hwang et al., 2009; Singh e Prerna, 2009), além de ser uma solução apropriada para regiões de clima tropical (Martinez et al., 2009), dentre outras.

O sucesso da aplicação de processos anaeróbios, especialmente os de alta taxa, depende fundamentalmente da manutenção, dentro dos reatores, de uma microbiota adaptada, com elevada atividade, e resistente a choques de cargas. O ensaio de atividade metanogênica de um lodo constitui-se numa importante avaliação para o monitoramento do processo anaeróbio, além de servir como um parâmetro de controle de estabilidade de reatores. Pode auxiliar na determinação das condições de partida de um reator, bem como da evolução e de possíveis alterações na qualidade da biomassa.

O teste de atividade microbiana pode ser utilizado para quantificar e qualificar o potencial da biomassa na conversão de substratos solúveis em metano e gás carbônico. A partir de quantidades conhecidas de biomassa e

de fontes de substrato, e sob condições estabelecidas, pode-se avaliar a produção de metano ao longo do período do ensaio. A utilização de diferentes fontes de substrato no ensaio de atividade metanogênica pode ser utilizada para obter uma indicação da provável composição das populações de microrganismos envolvidos na degradação de um resíduo orgânico complexo com predominância de carboidratos e proteínas, como as águas residuárias de suinocultura (Santana, 2004).

A compreensão da composição e comportamento dos microrganismos responsáveis pela degradação da matéria orgânica, poderá auxiliar profundamente na qualidade operacional e no controle de reatores anaeróbios. A importância das arqueias na digestão anaeróbia é amplamente conhecida, pois é responsável pela metanogênese, etapa final do processo. Apesar de reconhecida a importância do grupo microbiano, há poucos dados a respeito da diversidade em processos de tratamento anaeróbio de águas residuárias de suinocultura, especialmente no Brasil, bem como sobre o efeito de mudanças operacionais dos reatores na comunidade metanogênica.

OBJETIVO

Identificar as arqueias e avaliar a atividade metanogênica do lodo proveniente de um reator UASB e do filtro anaeróbio de fluxo ascendente, em série tratando águas residuárias de suinocultura.

MATERIAL E METODOS

Unidade Experimental

A unidade experimental (Figura 1) utilizada para o tratamento anaeróbio das águas residuárias de suinocultura foi um reator UASB (volume total de 300 L) seguido de um filtro anaeróbio de fluxo ascendente (volume total de 190 L), instalados em série.

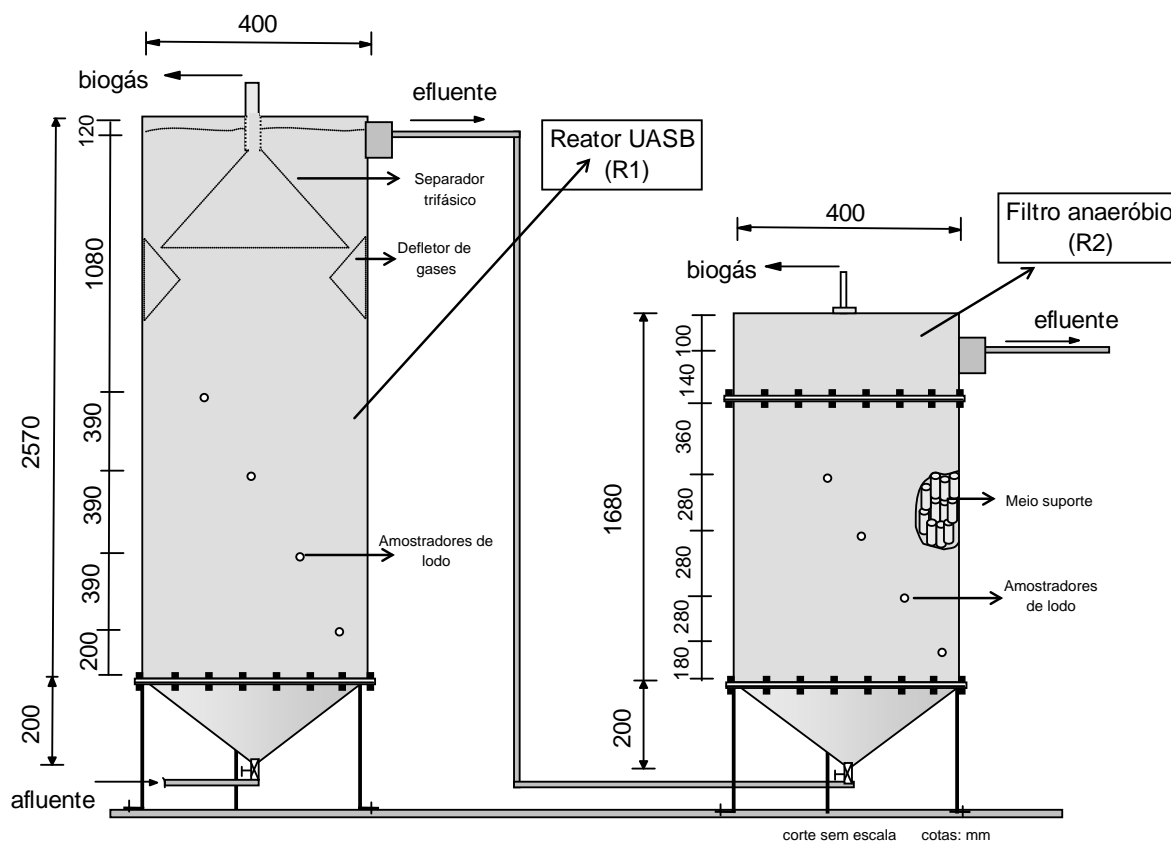


Figura 1. Representação esquemática das instalações experimentais compostas pelo reator UASB (R1) seguido do filtro anaeróbio (R2).

O meio suporte utilizado no filtro anaeróbio foi composto por anéis de bambu com área superficial específica e índice de vazios de 92,5 e 135,0 m² (m³) (Figura 2).



Figura 2. Fotos dos anéis de bambu utilizados como meio suporte no filtro anaeróbio de fluxo ascendente.

Afluente

Os dejetos utilizados como afluente foram coletados, diariamente, em confinamento de suínos na fase de terminação, com lâmina d'água, alimentados com ração à base de milho ou sorgo e soja, com complemento vitamínico e mineral.

Condições operacionais

O tempo de detenção hidráulico (TDH) aplicados nos reatores R1 e R2 foram de 12,0 e 5,8 h, respectivamente. A produção do biogás foi determinada pelo volume de biogás produzido diariamente no período diurno, medindo-se o deslocamento vertical dos gasômetros e multiplicando-se pela área da seção transversal interna dos gasômetros. A demanda química de oxigênio total (DQO_{total}), demanda química de oxigênio dissolvida (DQO_{diss} - 1,2 µm), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV) foram determinados conforme metodologia descrita por APHA, AWWA, WPCF (1998).

Atividade metanogênica específica (AME)

O ensaio da atividade metanogênica específica (AME) consistiu na determinação, por cromatografia gasosa, da concentração do gás metano presente no biogás armazenado no volume livre de frascos-reatores, do lodo coletado na região intermediária do reator UASB e do filtro anaeróbio de fluxo ascendente, no final do ensaio. Nos frascos-reatores foram adicionados 300 mL do lodo anaeróbio com sólidos voláteis (SV) em torno de 5 g L⁻¹. O lodo foi aclimatado às condições de temperatura do ensaio (30°C) por 24 horas. Foram adicionados individualmente como fontes de substrato o amido, glicose, propionato + butirato de sódio, acetato de sódio e formiato de sódio na concentração de 2,5 g DQO L⁻¹ em cada frasco-reator, para a determinação das atividades hidrolítica, acidogênica, acetogênica, metanogênica acetotrófica e metanogênica hidrogenotrófica, respectivamente. O ensaio foi realizado em duplicata. O monitoramento da concentração de metano foi realizado utilizando cromatógrafo de fase gasosa (Finigan GC-2001).

Filogenia das arqueias pela região RNAr 16S

A extração do RNA foi realizada do lodo coletado na região intermediária do reator UASB e do filtro anaeróbio de fluxo ascendente, no final do ensaio, conforme metodologia descrita por Hensiek et al. (1992). O primer utilizado para as arqueias foi o 5' CYGKTTGATCCYGSCRAG -3' e 5'- TGGGTCTCGCTCGTTG -3' (EMBLEY, 1992). Os fragmentos da PCR purificados foram clonados no sistema I de vetor pGEM-T (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Após a clonagem será realizada a transformação das células competentes de E. coli DH10b. Os clones estocados foram cultivados em multiplacas para a extração do DNA plasmidial. Após o sequenciamento das amostras, os dados obtidos foram analisados pelos programas "Sequencing Analysis 3.4" e "DNA Star" e a qualidade dos eletroferogramas das seqüências analisada pelo programa "Phred/Phrap/Consed" (Gordon et al., 1998). As seqüências selecionadas foram submetidas ao programa BLAST - "Basic Local Alignment Search Tool", (Altschul et al., 1997), para comparar com as existentes no banco de dados GenBank via "internet" do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Também foi verificada a identidade do material seqüenciado por meio do grau de homologia com as seqüências do GenBank. Os arquivos de saída do BLAST foram analisados pelo programa Ribossomal Database (RDP).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O sistema de tratamento anaeróbio composto pelo reator UASB (R1) e o filtro anaeróbio de fluxo ascendente (R2) em série tratando águas residuárias de suinocultura foi avaliado durante 110 dias. Durante este período a temperatura média do ar foi de aproximadamente 22,5 °C. O TDH, a carga orgânica volumétrica (COV) e as taxas de carregamento orgânico do lodo (TCL) aplicados no R1 e R2 foram de 12,0 e 5,8 h e de 25,2 e 4,4 gDQOtotal (L d)⁻¹, e de 1,9 e 0,3 g DQOtotal (gSV d)⁻¹, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Condições operacionais aplicadas no reator UASB (R1) e no filtro anaeróbio de fluxo ascendente (R2).

		Média	c.v. (%)
Tempo de operação (d)		110	-
TDH (h) ^(a)	R1	12,0	-
	R2	5,8	-
COV ^(b) (g DQOtotal (L d) ⁻¹)	R1	25,2	59,0
	R2	4,4	56,8
TCL ^(c) (g DQOtotal (gSV d) ⁻¹)	R1	1,9	42,3
	R2	0,3	62,1
Temperatura média do ar (°C)		22,5	9,5

(a) – Tempo de detenção hidráulico; (b) – carga orgânica volumétrica; (c) – Taxa de carregamento orgânico do lodo; c.v. – coeficiente de variação.

Os valores médios da DQOtotal, DQOdiss, SST e SSV do afluente do reator UASB foram de 12622; 1409; 8012 e 4643 mg L⁻¹. As eficiências médias de remoção de DQOtotal, DQOdiss, SST e SSV no R1 e no sistema de tratamento anaeróbio (R1+R2) foram de 90; 82; 92 e 89% e de 91; 85; 92 e 90%, respectivamente (Figura 3). As produções volumétricas de médias de metano foram de 0,793 e 0,122 Nm³ CH₄ (m³ d)⁻¹, no R1 e R2, respectivamente.

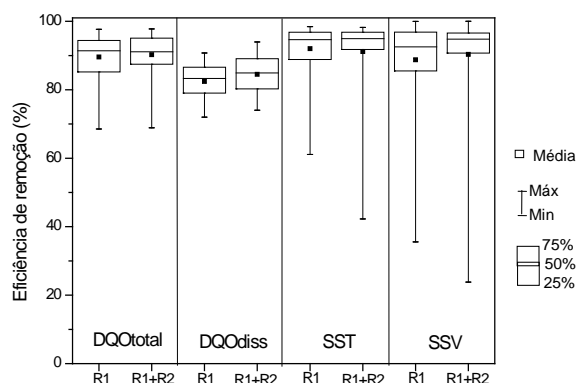


Figura 3. Eficiência de remoção de demanda química de oxigênio total (DQOtotal); demanda química de oxigênio dissolvido (DQOdiss - 1,2 µm), sólidos suspensos totais (SST) e sólidos suspensos voláteis (SSV).

Foi possível identificar microrganismos das famílias *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanosarcinaceae* e *Methanosarcinaceae*, incluindo os gêneros *Methanobrevibacter*, *Methanomethylovorans*, *Methanosarcina* e *methanobacterium*. Nas seqüências analisadas das arqueias do lodo do R1 e do R2 foram verificadas 58,2; 3,2; 3,2; 12,9 e 22,5% e 63,3; 6,6; zero, 13,4 e 16,7% de arqueias do gênero *Methanobrevibacter*, *Methanobrevibacter*, *Methanomethylovorans*, *Methanosarcina* e *methanobacterium*, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados das seqüências analisadas das arqueias do lodo do reator UASB (R1) e do filtro anaeróbio de fluxo ascendente (R2) a partir do banco de dados da Ribossomal Database (RDP).

Nome	Seqüências analisadas			
	R1	%	R2	%
Domínio Arquéia	80		59	
Filo Euryarchaeota	78		59	
Classe <i>Methanobacteria</i>	10		9	
Classe <i>Methanomicrobiana</i>	63		50	
Ordem <i>Methanomicrobiales</i>	23		22	
Ordem <i>Methanosarcinales</i>	37		27	
Ordem <i>Methanobacteriales</i>	10		9	
Família <i>Methanomicrobiaceae</i>	11		12	
Família <i>Methanobacteriaceae</i>	10		9	
Família <i>Methanosaetaceae</i>	18		19	
Família <i>Methanosarcinaceae</i>	5		4	
Gênero <i>Methanothrix</i>	18	58,2	19	63,3
Gênero <i>Methanobrevibacter</i>	1	3,2	2	6,6
Gênero <i>Methanomethylovorans</i>	1	3,2	0	0
Gênero <i>Methanosarcina</i>	4	12,9	4	13,4
Genero <i>Methanobacterium</i>	7	22,5	5	16,7
Arquéia não classificadas	2		0	
Euryarchaeota não classificadas	5		0	
<i>Methanomicrobia</i> não classificadas	3		1	
<i>Methanosarcinales</i> não classificadas	14		4	
<i>Methanomicrobiales</i> não classificadas	12		10	
<i>Methanomicrobiaceae</i> não classificadas	11		12	
<i>Methanobacteriaceae</i> não classificadas	2		2	
Microorganismos desconhecidos	4		5	

Os maiores valores de atividade observadas no R1 foram das acetogênica de 0,444 Mmol CH₄ (g SV h)⁻¹, seguidas das atividades hidrolítica, acidogênica, metanogênica acetotrófica e metanogênica hidrogenotrófica (Tabela 3). As atividades acidogênica, acetogênica, metanogênica acetotrófica e metanogênica hidrogenotrófica no R2 foram menores que as observadas no lodo do R1. Isto evidencia características diferentes do lodo do R1 e R2, consequência da separação do processo anaeróbio em dois estágios, principalmente, para a atividade acetogênica, indicando a predominância da produção de acetato no R1 e consequentemente conversão a metano, mesmo com as altas COV aplicadas no R1.

Tabela 3. Valores médios de atividade hidrolítica, acidogênica, acetogênica, metanogênica acetotrófica e metanogênica hidrogenotrófica da microbiota do lodo proveniente da manta do reator UASB (R1) e do lodo intersticial do leito fixo do filtro anaeróbio de fluxo ascendente (R2), no final do ensaio.

Atividade Mmol CH ₄ (g SV h) ⁻¹	Hidrolítica	Acidogênica	Acetogênica	Metanogênica acetotrófica	Metanogênica hidrogenotrófica
R1	0,259±0,01	0,238±0,02	0,444±0,04	0,202±0,03	0,108±0,07
R2	0,233±0,01	0,168±0,01	0,239±0,02	0,193±0,005	0,077±0,001

CONCLUSÕES

As eficiências médias de remoção de DQO_{total} e SST no sistema de tratamento anaeróbio em dois estágios (R1 + R2) foram superiores a 90%, para a aplicação de COV de 25,2 g DQO_{total} (L d)⁻¹ no reator UASB. Isto indica que o reator UASB seguido do filtro anaeróbio de fluxo ascendente pode ser uma alternativa econômica e robusta para o tratamento de águas residuárias de suinocultura com elevadas cargas orgânicas, dispensando o tratamento primário. Com a aplicação da técnica da metagenômica foi possível identificar no lodo do reator UASB e do filtro anaeróbio de fluxo ascendente arqueias das famílias *Methanomicrobiaceae*, *Methanobacteriaceae*, *Methanosaetacea* e *Methanosarcinaceae*, incluindo os gêneros *Methanosaeta*, *Methanobrevibacter*, *Methanomethylovorans*, *Methanosarcina* e *Methanobacterium*. A diversidade de arqueias presentes no lodo dos reatores UASB (R1) e do filtro anaeróbio de fluxo ascendente (R2), confirmam a ocorrência de intensa atividade metanogênica e o crescimento equilibrado de todas as populações microbianas envolvidas na digestão anaeróbia, necessárias para a degradação de um resíduo orgânico complexo com predominância de carboidratos e proteínas, como as águas residuárias de suinocultura.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, FAPESP e a Tigre S. A. pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APHA. AWWA, WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18 th. Washington, 1268 p, 1998.
2. ASTSCHUL, S.F; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, Oxford, 25, 3389-3402, 1997.
3. IBGE - Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2009). Disponível: <<http://sidra.ibge.gov.br>>, 2009.
4. GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. Genome Research, Toronto, 8, 195-202, 1998.
5. HWANG, K.; SONG, M.; KIM, W.; HWANG, S. Effects of prolonged starvation on methanogenic population dynamics in anaerobic digestion of swine wastewater. *Bioresource Technology*, Barking, in press, doi:10.1016/j.biortech.2009.03.070, 2009.
6. HENSIEK, R.; KRUPP, G.; STACKEBRANDT, E. Development of diagnostic oligonucleotide probes for four lactobacillus species occurring in the intestinal tract. Syst. Appl. Microbiol, 15, 123-128, 1992.
7. MARTINEZ, J.; DABERT, P.; BARRINGTON, S.; BURTON, C. Livestock waste treatment systems for environmental quality, food safety, and sustainability. *Bioresource Technology*, Barking, in press, doi:10.1016/j.biortech.2009.02.038, 2009.
8. MIRANDA, C. R. de. Ordenamento Sustentável da Suinocultura em Santa Catarina. Suinocultura Industrial, São Paulo, 7, 14- 19, 2005.
9. NDON, U. J.; DAGUE, R. R. Effects of temperature and hydraulic retention time on anaerobic sequencing batch reactor treatment of low-strength wastewater. Water Research, Oxford, v. 31, n. 10, p. 2455-2466, 1997.
10. SANTANA, A. M. de. Atividade da microbiota e desempenho de Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente com Manta de Lodo (UASB) em dois estágios tratando águas residuárias de suinocultura. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
11. SINGH, S.P.; PRERNA, P. Review of recent advances in anaerobic packed-bed biogas reactors. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 13, n.1, 1569–1575, 2009.