

Avaliação microscópica da endogenia microbiana em reatores UASB concêntricos, tratando água residuária do processamento dos frutos do café por via úmida

Júlia Ferreira da Silva^{1*}, Cláudio Milton Montenegro Campos¹, Erlon Lopes Pereira¹ e Vivian Galdino da Silva²

¹Universidade Federal de Lavras, Cx. Postal 3037, 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil. ²Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: ferreirajulia@yahoo.com.br

RESUMO. Com a utilização de duas técnicas de microscopia, eletrônica de varredura (MEV) e de epifluorescência, objetivou-se investigar o processo de endogenia da biomassa presente em reatores de manta de lodo e fluxo ascendente (UASB, do inglês *upflow anaerobic sludge blanket*). Dois reatores UASB concêntricos, funcionando em série, inseridos em um sistema-piloto de tratamento de águas residuárias do processamento dos frutos do café por via úmida, foram monitorados quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Os reatores UASB operaram em campo, com oscilação de temperatura ambiente entre 16,5 e 38,8°C; as temperaturas do afluente e efluente dos reatores variaram de 16,3 a 27,3°C, respectivamente. Os dados iniciais obtidos para a demanda química de oxigênio (DQO) foram de 1.349 e 1.173 mg L⁻¹, sendo, ao final do monitoramento atingido os valores de 120 e 102 mg L⁻¹ para os reatores 1 e 2, respectivamente. Concluiu-se que a microscopia aplicada ao perfil de sólidos dos reatores é muito importante e deve ser empregada como parâmetro de qualificação do lodo cultivado em reatores UASB, especialmente quando do decaimento bacteriano.

Palavras-chave: epifluorescência, microscopia eletrônica de varredura (MEV), qualidade da biomassa, UASB.

ABSTRACT. Microscopic evaluation of bacterial endogenia in concentric UASB reactors treating wastewater from wet process of coffee fruits. Using two microscopy techniques, scanning electronic microscopy (SEM) and of epifluorescence, the present study analyzed the degeneration process caused by endogenia, especially under inanition situation. Two concentric UASB reactors, working in series and designed for pilot scale systems, treating wastewater from wet process of coffee fruits, were monitored as regard to the parameters physical, chemical and microbiological. The UASB reactors functioned in the field, and the atmospheric temperature oscillated from 16.5 to 38.8°C, and the affluent and effluent liquid temperature varied between 16.3 and 27.3°C, respectively. The initial data obtained for chemical oxygen demand (COD) were 1349 and 1173 mg L⁻¹, and at the end of monitoring process the observed values for the same parameter were 120 and 102 mg L⁻¹ for the reactor 1 and 2, respectively. The microscopy analysis applied to the solids profile of the reactors shown to be fundamental and must be applied as a quality parameter of the cultivated sludge, in order to observe its quality along the reactors profile mainly due to its decay.

Keywords: epifluorescence, scanning electronic microscopy (SEM), sludge quality, UASB.

Introdução

O lodo do reator UASB se desenvolve em sua parte inferior e geralmente possui biomassa concentrada com alta atividade metanogênica, na forma de flocos ou grânulos. Este lodo geralmente é obtido por meio de um processo de seleção realizado pelo fluxo hidráulico ascendente, o tipo de substrato e a carga orgânica volumétrica (COV). Estes fatores devem ser considerados desde a partida do sistema, permitindo um fluxo de biomassa densa capaz de se desenvolver na parte inferior do reator (CAMPOS et al., 2005b).

De acordo com Neves et al. (2006), a microscopia eletrônica de varredura conhecida por MEV, ou SEM, do inglês *Scanning Electron Microscopy*, é largamente utilizada no estudo de biofilmes e de biomassa granular, permitindo obter informações sobre a morfologia microbiana das superfícies destes ecossistemas. Porém, a maior desvantagem desta técnica reside no fato de se basear na identificação visual, não sendo, por si só, uma técnica de identificação microbiana. A técnica da microscopia eletrônica de varredura foi utilizada pelos autores para observar o inóculo e a evolução da

biomassa no estudo da granulação durante a partida de um reator UASB sendo encontrado um variado conjunto de bactérias, na sua maioria, do grupo das *Archaeas* metanogênicas. A análise permitiu, ainda, quantificar alterações morfológicas e de tamanhos em consórcios microbianos, durante os processos de granulação e também de desmanche dos grânulos.

O microscópio eletrônico de varredura produz uma imagem tridimensional da superfície de amostras não seccionadas e a imagem é visualizada por meio de um computador acoplado ao microscópio. Os elétrons “varrem” a superfície externa do material, não atravessando a amostra. A imagem é formada a partir da amostra, quando a mesma é atingida pelo feixe de elétrons. Os elétrons secundários são captados e, após passarem por um amplificador, são transformados em imagem visível em um monitor de alta resolução (MELO, 2002).

Neste trabalho, objetivou-se estudar o processo de degeneração por endogenia do lodo, utilizando análises de epifluorescência e MEV para avaliação qualitativa da biomassa de reatores UASB concêntricos, como parâmetros microbiológicos no monitoramento de reatores anaeróbios.

Material e métodos

A água residuária do pré-processamento dos frutos do café era encaminhada ao sistema de tratamento, composto por gradeamento, caixa de areia, lagoa de estabilização, dois reatores UASB concêntricos (Reator Central-R1 e Reator Periférico-R2) trabalhando em série, com volumes de 1.944 e de 2.490 L, respectivamente, um reator anaeróbio híbrido (RAH) com volume útil de 3.145 L, dois reatores aeróbios (lodos ativados) operando em batelada com volume útil de 6.870 L cada, dois reservatórios de efluentes tratados com volumes de 30.259 e 12.636 L e um leito de secagem do lodo. As unidades anaeróbias eram equipadas com equalizador de pressão, três filtros de H₂S, sistema de bombeamento, medidores de biogás e sistema de registro de temperatura. O monitoramento do sistema foi iniciado 30 dias após o término do período de colheita. Durante o monitoramento, foram realizadas três alterações nas vazões e, em função dessas alterações, o monitoramento foi dividido em três fases, com diferenças nos tempos de detenção hidráulica e nos parâmetros analisados.

Reatores UASB

Os reatores estudados apresentam-se como uma novidade em bioprocessos na agroindústria (Figura 1). Foram construídos concêntricos, em resina poliéster ortoftálica, com catalisador Merck® e manta de fibra

Roving reforçada com chapa de aço, com cobertura de *gel-coat* ortoftálico. O UASB central, com altura útil de 6,25 m, possuía 14 pórticos de amostragem, sendo que os quatro últimos foram preenchidos com lodo (inóculo de esgoto doméstico), separador trifásico, construído em fibra de vidro com 1,90 m de altura. O UASB periférico possuía dez pórticos e altura útil de 4,40 m. O biogás produzido nos reatores era conduzido a um equalizador de pressão, fabricado em resina éster vinílica reforçada com fibra de vidro, acabamento interno polido em *gel-coat*, totalmente atóxico, com diâmetro de 450 mm e comprimento total de 2,00 m. Os filtros de H₂S eram um conjunto de três unidades, fabricados em resina éster vinílica reforçada com fibra de vidro, acabamento interno polido em *gel-coat*, com diâmetro de 150 mm e comprimento total de 1,00 m. Dentro deles foi colocada esponja de aço para remoção de H₂S.

Depois de purificado o gás gerado era encaminhado para os medidores de biogás compostos por um sistema constituído de um medidor de gás para o Reator 1, outro para o Reator 2 e um terceiro para o RAH, com três lançadores de chama para queima do biogás e sistema de *flare* automatizado. Os medidores eram da marca Liceu de Artes, com capacidade de medir vazões de 0,016 a 1,6 m³ h⁻¹ a uma pressão máxima de 50 kPa. O sistema era operado por meio de CLP (controle lógico programável), sendo inteiramente automatizado.

Parâmetros analisados

A DQO foi analisada pelo método 5220 D (digestão por refluxo fechado por espectrofotometria), os sólidos totais pelo método 2540 B (estufa a 103–105°C); os sólidos totais fixos (STF) e os sólidos totais voláteis (STV) pelo método 2540 E (mufla a 550°), o potencial hidrogeniônico (pH), foi obtido por peagâmetro da marca Hach, modelo Sension 4, de acordo com o método potenciométrico 4500-H⁺-B (APHA, 1998), todos propostos pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

A alcalinidade e a acidez foram medidas por potenciometria, segundo metodologia desenvolvida por Ripley et al. (1986), descrita por Chernicharo (2007).

Microscopia de epifluorescência

As amostras de lodo foram retiradas do décimo terceiro pórtico de amostragem do reator central, diluídas (1/5) com água destilada, pipetadas em lâminas e levadas para observação em microscópio eletrônico de epifluorescência da marca Olympus,

modelo BX60, para verificar a fluorescência das *Archaeas* metanogênicas. As imagens foram capturadas e gravadas.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras de lodo retiradas do décimo terceiro pórtico de amostragem do reator central foram preparadas seguindo protocolo do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Lavras. As amostras foram pipetadas ($\pm 0,5$ mL) em lamínulas circulares com 1,0 mm de diâmetro, guardadas em placas de Petri de 30 mm.

Depois foram imersas em solução fixativa de Karnovisk modificado com pH neutro de 7,2 por 1h. Foram lavadas três vezes com solução tampão de cacodilato durante 10 min. cada. Na terceira lavagem foram acrescentadas, em ambiente protegido, 16 gotas de solução de tetróxido de ósmio. As placas de Petri foram envoltas com parafilme, para retenção do gás do ósmio e, após 4h, as amostras foram novamente lavadas por três vezes em água destilada e posteriormente desidratadas por três vezes em gradiente de acetona durante 10 min. cada (25, 50, 75, 90 e 100%), sendo a de 100% por 3 vezes de 10 min. Em seguida, foram colocadas em dessecador por 24h para completar a secagem.

Após a secagem, as lamínulas contendo as amostras foram colocadas no suporte metálico e então feita a cobertura de ouro (*sputter coater*) em aparelho da marca BAL-TEC SC, modelo SCD050. Esse revestimento em ouro é necessário para retirar a permeabilidade da amostra, facilitando a visualização no microscópio. As amostras foram observadas em

microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo EVO 40 LEO e as imagens geradas eram registradas digitalmente.

Produção estimada de metano

A produção de metano (CH_4) foi estimada em função da carga de DQO removida nos reatores e determinada de acordo com as equações 1, 2 e 3.

$$P = P_0 \cdot e^{-\frac{Mgz}{RT}} \quad (1)$$

em que:

- P = pressão atmosférica local (atm);
- P_0 = pressão atmosférica ao nível do mar (1 atm);
- M = massa molar média do ar ($0,0289 \text{ kg mol}^{-1}$);
- g = constante gravitacional ($9,806 \text{ m s}^{-2}$);
- z = altitude local (920 m);
- R = constante dos gases ($0,08206 \text{ atm L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);
- T = temperatura (K).

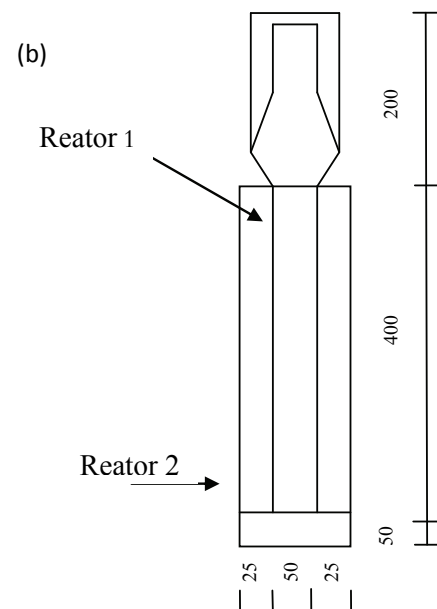
$$K(t) = \frac{PK}{R(T + 27\epsilon)} \quad (2)$$

em que:

- $K(t)$ = fator de correção da temperatura operacional do reator (g DQO L^{-1});
- P = pressão atmosférica local (atm);
- K = DQO_{total} correspondente a um mol de CH_4 ($64 \text{ g DQO mol}^{-1}$);
- R = constante dos gases ($0,08206 \text{ atm L mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$);
- T = temperatura operacional do reator ($^{\circ}\text{C}$).



(a)



(b)

Figura 1. Reator UASB concêntrico: (a) Vista parcial - (b) corte longitudinal (medidas em centímetros).

$$K_{CH_4} = \frac{c \text{ carga de DQO removida}}{K(t)} \cdot 1000 \quad (3)$$

em que:

V_{CH_4} = volume estimado de produção de metano ($m^3 \text{ dia}^{-1}$);

Carga de DQO_{REM} ($kg \text{ dia}^{-1}$) = vazão ($m^3 \text{ dia}^{-1}$) x concentração de DQO_{REM} ($kg \text{ m}^{-3}$).

Resultados e discussão

pH, acidez e alcalinidade

Antes da primeira partida do sistema, o pH observado era de 5,4, sendo o valor mínimo encontrado, porém, no início do monitoramento o pH se manteve próximo de 7 e durante todo o período de operação, o pH ficou mais próximo de 8, mas ainda na faixa suportada pelas *Archaeas* metanogênicas, podendo-se, ainda, conseguir estabilidade na formação de metano, cujo pH se situa entre 6,0 e 8,3. Fora dessa faixa, pode ocorrer inibição das *Archaeas* metanogênicas (CHERNICHARO, 2007).

A acidez média e a alcalinidade total observadas no afluente do UASB central foram de 56 e 443 $mg \text{ L}^{-1}$, respectivamente, no efluente do UASB periférico os valores foram de 52 e 452 $mg \text{ L}^{-1}$, respectivamente.

Comparando-se a relação acidez/alcalinidade total, pode-se verificar que o sistema operou em condições mais alcalinas, se mantendo estável, em torno de 0,5, próxima daquela observada para esgotos domésticos (0,3), evidenciando a baixa concentração do efluente e da biomassa nos reatores. De acordo com Von Sperling (2006), essa relação é o melhor parâmetro para se observar a estabilidade do sistema, visto que, durante a digestão anaeróbia, ela se fundamenta na capacidade de tamponamento do sistema, e capaz de neutralizar os ácidos voláteis formados no processo.

Temperatura

As temperaturas médias observadas no afluente e no efluente do Reator 1 foram de 23,9 e 23,4°C, respectivamente e, no afluente e efluente do Reator 2 foram de 23,4 e 23,4°C. As temperaturas se mantiveram constantes ao longo de todo o período de monitoramento e a temperatura ambiente média observada foi de 25°C, com mínima de 16,5°C e máxima de 38,8°C.

Concentração da biomassa

O Reator central recebeu inóculo com concentração total de SVT (sólidos voláteis totais) de 288,38 $kg \text{ m}^{-3}$, ocupando um percentual de 40% do reator. O volume de lodo no início do monitoramento foi de 0,78 m^3 e, no final, este volume

correspondia a 0,32 m^3 , o que correspondeu a 41% do volume de lodo inicial, colocado na partida. Durante o monitoramento percebeu-se que houve diminuição da concentração de SVT, com valor final de 173,24 $kg \text{ m}^{-3}$, correspondente a 57% da quantidade inicial. Ficou claro, portanto, que a carga orgânica afluente não foi suficiente para alimentar a biomassa ativa, que possuía inicialmente elevada atividade microbiana, decorrendo, assim, o processo de endogenia.

O Reator 2 não recebeu inóculo e, uma vez que a carga orgânica era insuficiente para o Reator 1, não foi verificada formação de manta de lodo durante o monitoramento deste reator, a concentração inicial de SVT foi de 5,09 $kg \text{ m}^{-3}$ decrescendo para 3,16 $kg \text{ m}^{-3}$ ao final da pesquisa.

Os parâmetros observados no início do monitoramento, para os reatores 1 e 2, foram: vazão de 2,67 $m^3 \text{ h}^{-1}$, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 17,5 e 22,4h, $DQO_{méd}$ 1.349 e 1.173 $mg \text{ L}^{-1}$, carga orgânica volumétrica (COV) de 1,853 e 1,260 $kg \text{ DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$; carga orgânica biológica (COB) de 0,145 e 2,466 $kg \text{ DQO kg SVT}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e carga de sólidos (SVT) de 288,38 e 5,09 $kg \text{ m}^{-3}$, respectivamente.

Ao final do monitoramento, os parâmetros de DQO, COB e carga de sólidos sofreram uma queda brusca, em virtude do processo de endogenia ocorrido nos dois reatores. Os valores observados, para os reatores 1 e 2, foram: vazão de 5,65 $m^3 \text{ h}^{-1}$, tempo de detenção hidráulica (TDH) de 8,3 e 10,6h, $DQO_{méd}$ 120 e 102 $mg \text{ L}^{-1}$, carga orgânica volumétrica (COV) de 0,349 e 0,232 $kg \text{ DQO m}^{-3} \text{ dia}^{-1}$; carga orgânica biológica (COB) de 0,048 e 0,510 $kg \text{ DQO kg SVT}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ e carga de sólidos (SVT) de 173,24 e 3,16 $kg \text{ m}^{-3}$, respectivamente. A elevação da vazão, com consequente diminuição do TDH e aumento da carga orgânica biológica, aumentou o regime de trabalho do sistema, porém, o sistema ainda funcionou em condições não ideais.

Produção estimada de metano

A diminuição da concentração de sólidos nos reatores, devido ao fenômeno de endogenia, prejudicou o processo de digestão anaeróbia e, consequentemente, a produção de biogás. Esta diminuição foi avaliada, também, pela atividade metanogênica estimada nos reatores em função da produção estimada de metano (Tabelas 1 e 2), durante as três fases do monitoramento, em que a vazão foi aumentada.

Metcalf e Eddy (2003) avaliaram que a composição do biogás varia durante a digestão anaeróbia no reator, em função das condições de ambiência e do mecanismo do processo e essa composição pode variar no início do processo e no decorrer do mesmo, quando ocorre qualquer variação no processo de digestão.

Tabela 1. Parâmetros observados no Reator 1, durante as três fases do monitoramento do sistema-piloto de tratamento da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro.

Vazão (m ³ h ⁻¹)	TDH (h)	CH ₄ (m ³ dia ⁻¹)	SVT (kg m ⁻³)	AM estimada (m ³ CH ₄ kg SVT ⁻¹ dia ⁻¹)
2,67	17,47	0,3314	310,84	0,01306
3,16	14,76	0,0975	243,70	0,00490
5,65	8,26	0,0581	173,24	0,00411

Tabela 2. Parâmetros observados no Reator 2, durante as três fases do monitoramento do sistema-piloto de tratamento da água residuária do processamento dos frutos do cafeeiro.

Vazão (m ³ h ⁻¹)	TDH (h)	CH ₄ (m ³ dia ⁻¹)	SVT (kg m ⁻³)	AM estimada (m ³ CH ₄ kg SVT ⁻¹ dia ⁻¹)
2,67	22,35	0,1740	4,73	0,09869
3,16	18,88	0,0856	3,06	0,09168
5,65	10,56	0,0244	3,16	0,02154

Foi verificada estagnação na produção de biogás principalmente pela baixa carga orgânica aplicada ao sistema, uma vez que houve diminuição da concentração de matéria orgânica afluyente, provocando inanição e conseqüentemente queda das *Archaeas* metanogênicas, refletindo na diminuição da produção de biogás.

No trabalho de Campos et al. (2005a) o volume do biogás produzido foi influenciado pela variação de pressão causada pela altura da coluna d'água do sistema de armazenamento, os autores relataram que ocorreram perdas de biogás no separador de três fases, em especial dos gases CO₂ e CH₄, cuja concentração

no meio líquido era dependente da temperatura e da pressão parcial, o que fez com que a produção de biogás medido fosse menor do que aquela prevista teoricamente com base em considerações estequiométricas, resultando em medições práticas com valores abaixo de 20 a 50% da produção teórica.

Microscopia de epifluorescência

A microscopia de epifluorescência tem sido descrita como um método adequado para avaliação rápida e direta da viabilidade celular de micro-organismos anaeróbios.

As amostras analisadas em microscopia de epifluorescência confirmaram a baixa concentração de biomassa metanogênica ativa no final do monitoramento. As imagens, mostrando a autofluorescência das *Archaeas* metanogênicas, são apresentadas na Figura 3. A autofluorescência se deve às coenzimas e cofatores específicos, como coenzima F₄₂₀, coenzima F₄₃₀, coenzima M, metanoplerina e metanofurano (NEVES et al., 2006).

Microscopia eletrônica de varredura

As amostras analisadas, em microscopia eletrônica de varredura, também apresentaram baixo índice de microrganismos, confirmando a baixa concentração da biomassa ativa principalmente no final do monitoramento. As imagens geradas estão apresentadas nas Figuras 4 e 5.

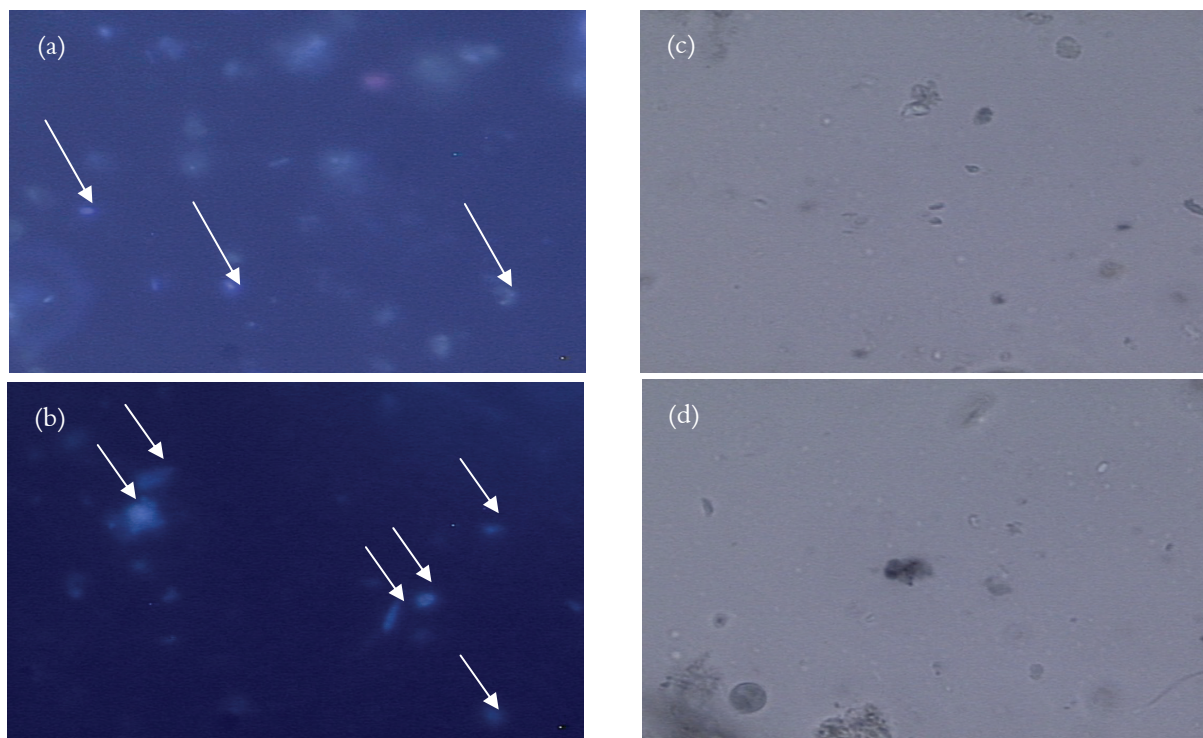


Figura 3. Fotomicrografia de epifluorescência das amostras do 13º compartimento de digestão do Reator 1 do sistema-piloto de tratamento da água residuária do café, sob luz fluorescente (a, b) e sob luz branca (c, d). Setas indicam possíveis *Archaeas* metanogênicas, autofluorescentes.

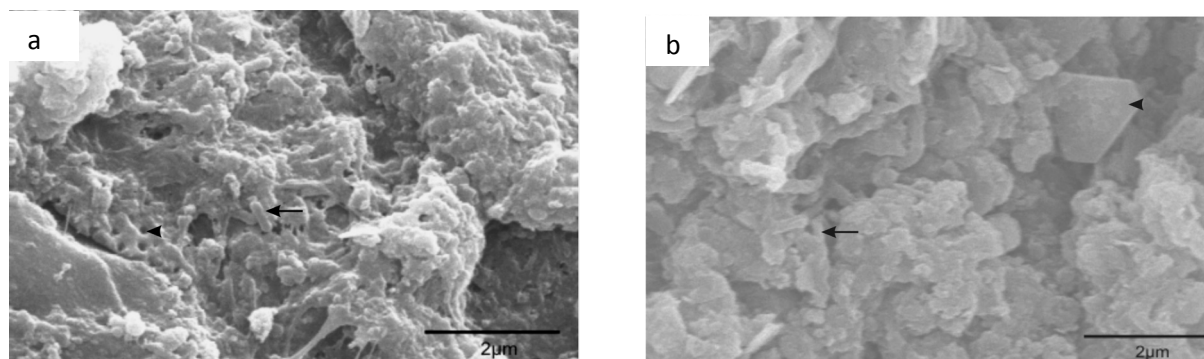


Figura 4. Eletromicrografia de varredura das amostras do Reator 1, do sistema-piloto de tratamento da água residuária do café. (a) Lodo com maior concentração de bactérias (seta indica bactéria e cabeça de seta indica possível saída das bolhas de biogás); (b) fragmentos de mineral na manta de lodo (seta indica bactéria e cabeça de seta indica partes dos fragmentos).

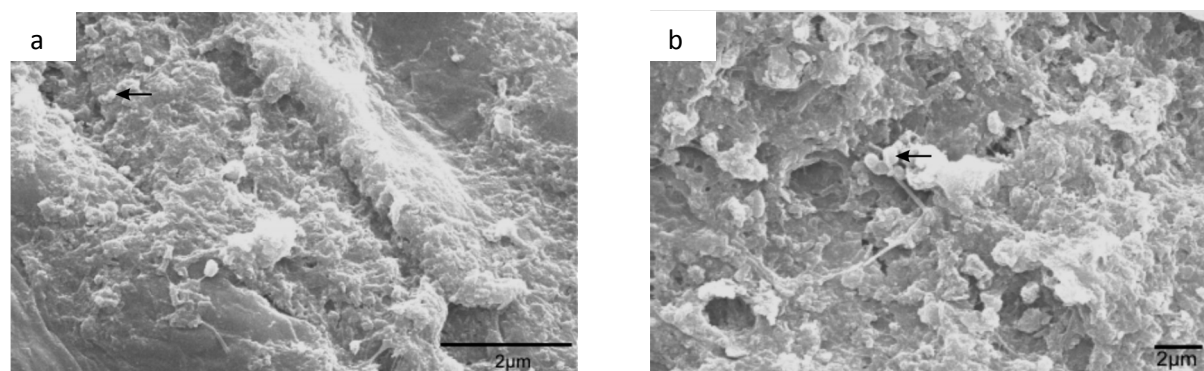


Figura 5. Eletromicrografia de varredura das amostras do 13º compartimento de digestão do Reator 1 do sistema-piloto de tratamento da água residuária do café. (a, b) Lodo com concentração de bactérias do gênero *Coccus* (setas indicam bactéria *Coccus*).

Conclusão

As análises de alcalinidade, acidez, pH e temperatura, durante o experimento, mostraram que estes parâmetros permaneceram em faixas adequadas à anaerobiose, evidenciando que a baixa concentração de matéria orgânica foi o fator limitante para o desenvolvimento microbiológico.

Foi possível verificar uma pequena quantidade de *Archaeas* metanogênicas no lodo, confirmando o processo de endogenia durante o monitoramento do sistema por meio das análises de microscopia de epifluorescência. Estas análises podem ser consideradas adequadas ao se monitorar o decaimento bacteriano.

As análises de microscopia eletrônica de varredura possibilitaram a verificação da estrutura da biomassa durante o processo de endogenia, podendo-se observar as estruturas por onde sai o biogás produzido e a pequena quantidade de bactérias presentes no consórcio granular.

A baixa concentração de microrganismos, estimada pelo uso estrito das técnicas citadas, entretanto, para outras inferências, outras estratégias seriam demandadas.

Conclui-se que a microscopia é uma ferramenta imperativa em estudos da anaerobiose.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapemig, pelo suporte financeiro de toda a instalação do sistema, e também à equipe técnica do Laboratório de Análise de Água do Departamento de Engenharia – Laadeg/UFLA.

Referências

- APHA-American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** Washington, D. C.: APHA, 1998.
- CAMPOS, C. M. M.; MOCHIZUKI, E. T.; DAMASCENO, L. H. S.; BOTELHO, C. G.; Avaliação do potencial de produção de biogás e da eficiência de tratamento do reator anaeróbio de manta de lodo (UASB) alimentado com dejetos de suínos. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 4 p. 848-856, 2005a.
- CAMPOS, C. M. M.; SALEH, B. B.; CARMO, F. R. Determination of kinetic parameters of a lab-scale upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB) removing organic loading from swine manure effluents. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 1045-1051, 2005b.
- CHERNICHARO, C. A. L. **Reatores anaeróbios.** Belo Horizonte: UFMG; DESA, 2007. v. 5.
- MELO, R. C. N. **Células princípios básicos e práticos.** Juiz de Fora: UFJF, 2002.

METCALF and EDDY. **Wastewater engineering: treatment, disposal and reuse**. 4th ed. New York: McGraw-Hill, 2003.

NEVES, L.; RIBEIRO, R.; OLIVEIRA R.; ALVES, M. M. Enhancement of methane production from barley waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, n. 6, p. 599-603, 2006.

RIPLEY, L. E.; BOYLE, W. C.; CONVERSE, J. C. Improved alkalimetric monitoring for anaerobic digestion of high-strength wastes. **Journal of Water Pollution Control Federation**, v. 8, n. 5, p. 406-411, 1986.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Princípios do

tratamento biológico de águas residuárias. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 2006. v. 2.

Received on September 18, 2009.

Accepted on November 27, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.