

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**VERÔNICA MARINHO FONTES ALEXANDRE**

EFEITO DE BIOSURFACTANTES NA REDUÇÃO DA GERAÇÃO DE BIOMASSA EM  
SISTEMAS DE LODOS ATIVADOS

RIO DE JANEIRO

2018



Verônica Marinho Fontes Alexandre

EFEITO DE BIODISSURFACTANTES NA REDUÇÃO DA GERAÇÃO DE BIOMASSA EM  
SISTEMAS DE LODOS ATIVADOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadoras:

Magali Christe Cammarota, D. Sc.

Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

Rio de Janeiro

2018

A366e

Alexandre, Verônica Marinho Fontes

Efeito de biossurfactantes na redução da geração de biomassa em sistemas de lodos ativados / Verônica Marinho Fontes Alexandre. -- Rio de Janeiro, 2018. 163 f.

Orientadora: Magali Christe Cammarota.

Coorientadora: Denise Maria Guimarães Freire.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. redução de lodo. 2. lodos ativados. 3. biossurfactante. 4. ramnolipídeo. I. Cammarota, Magali Christe , orient. II. Freire, Denise Maria Guimarães, coorient. III. Título.

Verônica Marinho Fontes Alexandre

EFEITO DE BIODISSURFACTANTES NA REDUÇÃO DA GERAÇÃO DE BIOMASSA EM  
SISTEMAS DE LODOS ATIVADOS

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB), Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 28 de agosto de 2018.

---

Magali Christe Cammarota, D. Sc., UFRJ (orientadora)

---

Denise Maria Guimarães Freire, D. Sc., UFRJ (co-orientadora)

---

Gandhi Giordano, D. Sc., UERJ

---

Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D. Sc., INT

---

João Paulo Bassin, D. Sc., UFRJ

---

Ivaldo Itabaiana Júnior, D. Sc., UFRJ



Dedico este trabalho aos meus alunos em 2015-16, que me abriram os olhos para um outro (e tão importante e divertido quanto) lado da vida. Obrigada por transformarem minha visão de mundo!





## Agradecimentos

E aqui se encerra mais uma etapa da longa jornada. Não, eu não sabia. Mesmo com (e por causa de) tudo de errado nos sistemas da vida, tive dúvidas, medos, receios, crises. Continuo com todos, mas com menos um peso nas costas. E por isso agradeço com todo meu coração a todos que contribuíram para minha longa e quase eterna caminhada. O doutorado foi um divisor de águas, e sem vocês, tudo teria sido mais difícil.

Primeiramente, devo e quero agradecer a Deus e ao plano espiritual por toda ajuda e bênçãos concedidas. Por mais que às vezes eu possa parecer não tão agradecida, tenho certeza que fui muito abençoada ao longo de todos esses anos e que alguns tropeços na verdade foram por algo maior. Tentando ser menos cética, sei que tem muita gente aí em cima olhando e zelando por mim. Obrigada pelo carinho, atenção e por indicarem luz e anjos nos meus caminhos (ainda estou aprendendo a reconhecer).

Em segundo lugar não tem como não ser a minha orientadora Magali. Com base nesta tese, acho que não existiu orientadora mais orientadora, presente em todos os momentos, dando "liberdade de criação", por assim dizer, aceitando ou não minhas ideias, mas promovendo um debate que foi fundamental e essencial para minha formação. Neste estudo, você mostrou o real motivo pelo qual há necessidade de orientação em um doutorado. Obrigada por iluminar o caminho sempre que ele se mostrou tão obscuro e por ter tanta paciência com esses meus resultados tão loucos e tão pouco convencionais. Espero um dia ter metade de sua sagacidade e capacidade de orientar. Você é um grande exemplo de pesquisadora. Obrigada por nunca deixar faltar material para que possamos desenvolver o melhor trabalho possível. Obrigada por estar sempre disponível para as correções, contribuindo tanto para a melhoria dos trabalhos. Obrigada por ter me inserido em diferentes projetos de pesquisa, obrigada por ter me ajudado com o preparo das aulas, obrigada por todos os ensinamentos e exemplos. Meu agradecimento a você será eterno, e sei que eu não conseguiria concluir essa etapa sem todo apoio e suporte que você me ofereceu desde sempre.

À segunda orientadora, Denise, presente no meu início na pesquisa e agora, neste grande marco. Obrigada por ter apontado todos os bodes e me ter feito rir quando todos resolveram vir juntos para dentro da sala (ou do reator). Obrigada por ter disponibilizado material e pessoal para a produção de ramnolípídeo. E por ter aceito essa jornada diferente.

Ao Cenpes/Petrobras pelo financiamento de grande parte deste projeto. Em especial à Vania Maria J. Santiago e Ana Claudia F. P. de Cerqueira por terem introduzido a redução de lodo em minha vida. No início torci o nariz, mas me surpreendi. Obrigada pelas trocas de ideias nas reuniões e pelos ensinamentos. Minha vida profissional está muito atrelada às oportunidades que vocês me deram e, por isso, serei sempre grata. E, claro, obrigada pelo fornecimento de efluente e lodo, fundamentais para o desenvolvimento inicial deste estudo.

À Estação de Tratamento de Esgotos localizada no município do Rio de Janeiro, que gentilmente forneceu lodo para que eu pudesse concluir os estudos.

Ao Fábio Diniz e Douglas Braga pela eterna ajuda com a quantificação de ramnose e determinação de CMC. A simpatia e o bom humor de vocês é contagiante! Muito obrigada pelos bons momentos, mesmo que tão poucos. Ao Rui de Paula Vieira de Castro por também me ajudar bastante com tudo do ramnolípídeo, sempre se mostrando disposto a ajudar e trocar ideias. A todos que contribuíram com a produção de ramnolípídeo: Livia Vieira de Araújo, Antonio Carlos de Oliveira Machado e Vinícius Mattos de Mello, além do Fábio e do Douglas. Um agradecimento especial à Fernanda Ribeiro do Carmo Damasceno, que além de ter me ajudado em uma fermentação, se tornou uma grande amiga e grande inspiração neste outro lado da vida profissional que acabei descobrindo. Obrigada pelas (muitas, muitas) risadas, pelos conselhos e pelo apoio. Você foi para longe de mim, mas tenho certeza que nossos caminhos vão continuar se encontrando. Se não em Xerém, em qualquer outro lugar! Obrigada por ter cruzado e ficado em meu caminho e por ter me ajudado e incentivado tanto, tanto!... Você é um dos maiores presentes que o LTA me deu ao longo desses mais de dez anos! A cada dia que passa te admiro mais e mais!

Aos amigos do LTA, em especial ao João Paulo Garuzi Luz Machado por ter ajudado em parte dos experimentos e à Tayane Miranda Silva de Castro, por ter sido imprescindível ao longo de todo o estudo, e por ter acreditado no ramnolípídeo tanto quanto eu. Sem você eu não teria qualificado e, conseqüentemente, não teria defendido. À Claudia Ferreira Gerhardt, Luana Ferreira Afonso e Eduardo Ferreira da Silva Junior, que junto com a Tayane e com a Fernanda me proporcionaram momentos de desabafo, mas principalmente de descontração. Vocês foram meu porto seguro na EQ nesse período conturbado, e me ensinaram muitas coisas. Obrigada por não terem desistido de mim e por serem essas pessoas tão fantásticas com as quais tive o prazer de conviver! Nossos momentos dentro e fora do laboratório estarão sempre guardados em minha memória. Mas acho que fazer nosso livrinho e nosso troféu vai ajudar muito com o passar dos anos...

A todos os colegas do LTA com quem convivi neste tempo e que me proporcionaram diferentes aprendizados. Em especial, à Franknairy Gomes Silva por ser essa pessoa tão divertida e de bem com a vida, animando sempre os dias! Exceto nos dias de fazer milhares de DQO. Aí eu aprendi a fazer silêncio para te deixar diluir... Minha vida é dividida em pré- e pós-Fran, mas pode substituir o “Fran” por “arroz de leite”... Obrigada também por suas contribuições ao livrinho, que deveriam te garantir um troféu! Ao Damázio Daniel de Lima Santos, por ser tão calmo, animado, divertido e que também proporcionou bons momentos no laboratório. Obrigada também à Helena Rodrigues Oliveira, que já chegou chegando e me garantiu algumas boas risadas.

Aos professoresIVALDO Itabaiana Jr, João Paulo Bassin e Gandhi Giordano, que enriqueceram minha visão da tese no exame de qualificação. À professora Viridiana Santana Ferreira Leitão e à Lívia Ribeiro Vasconcelos de Sá, por terem me ensinado tanta coisa além do assunto da disciplina Bioenergia, Biocatálise e Meio Ambiente. Acho que meu ponto de virada na pesquisa foi nessa semana de imersão no INT. Obrigada por terem sido um grande exemplo. À professora Melissa Gutarra, por me ajudar com a estatística e conceitos bioquímicos sempre que preciso. E por ter aceito representar a Fernanda em um momento delicado, garantindo um apoio que foi essencial para mim. À professora Eliana Flavia Camporese Servulo, que apesar de não ter participado efetivamente deste trabalho, sempre ajuda o lado pessoal com seu carinho e dedicação, que diria serem únicos na EQ. Obrigada por todo apoio e incentivo. À professora Lidia Yokoyama, que se mostrou disponível sempre que precisei de algo. Obrigada por também ser inspiração na EQ com sua calma e disposição para ajudar. E à professora Denize Dias de Carvalho por ter me ajudado tanto no preparo das aulas, tirando minhas dúvidas e me confortando para que eu fosse menos desesperada, mesmo eu tendo continuado (muito) desesperada...

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Industrial por todas as trocas e toda a disponibilidade em tudo que a gente precisa, e vice-versa. É muito bom saber que nesse mundo estranho e doido ainda conseguimos encontrar boas parcerias e pessoas de bom coração. Agradecimento especial para Juliana Cruz, rainha eterna da sinceridade na pesquisa, e que, mesmo de longe, me confortou e me ensinou a “desapegar”. Sua ajuda foi além, veio para a vida. Muito, muito obrigada! Que seu caminho seja tão iluminado quanto a luz que você me ofereceu. Ao Douglas Guedes Ferreira pelas muitas palavras de apoio e por me ter feito rir em momentos de desespero. Que a gente consiga ainda desenvolver muitas parcerias por esse mundo afora... E à Danielle Aparecida Duarte Nunes, que transmitiu sua vivência para que eu pudesse juntar forças para concluir essa etapa.

Ao amigo Thiago Rocha dos Santos Mathias por ser uma inspiração como professor, sempre disponível aos alunos, contribuindo efetivamente para a formação de bons profissionais e, acima de tudo, boas pessoas. E por sempre me afirmar que doutorado é isso mesmo, e que o grande dia um dia chega e a vida pode efetivamente começar. Obrigada pela ajuda em momentos críticos. À amiga Priscilla Badega Machado pelas palavras de apoio, broncas e incentivo sempre que necessário. E por também ser um excelente exemplo de profissional e pessoa para mim. E à Bruna Cabral Araújo, rindo do meu desespero, mas sempre presente. Desde o início da graduação com vocês... Obrigada por tudo!

Ao Pedro Paulo Ferreira de Carvalho, aluno incrível que, sob orientação do Thiago, realizou os experimentos do plaqueamento e embarcou, mesmo que brevemente, nessa jornada junto comigo. Muito obrigada a vocês! Espero que ainda possamos desenvolver muitos trabalhos juntos. Principalmente se a estatística ajudar a embasar os resultados...

À amiga Gisele dos Santos Costa por também sempre ficar na torcida, fornecendo apoio emocional e dicas holísticas. Agradeço também à Caroline Alves Cayres, com quem não tinha muito contato, mas que também se mostrou uma excelente inspiração para a vida, com toda sua calma e elegância e palavras de conforto. Estamos todos juntos, né?! Espero que um dia a gente consiga se juntar para modificar umas coisinhas por aí... Muito, muito obrigada pelas diversas trocas! E à queridíssima Gabriely Fornazier Brunhara, que ficou pouco tempo efetivamente no lab, mas talvez possa ter ficado para a vida. Obrigada por suas palavras de carinho e pelas belas risadas por aí... Que sua força de vontade e bom humor continuem servindo de inspiração para todos!

A todos os familiares e amigos externos que forneceram ajuda, caronas e descontração sempre que precisei.

Agradeço também aos meus pais por terem fortalecido meu gosto por estudos desde pequena e por terem feito tudo para que eu conseguisse todas as conquistas, essa em especial. Principalmente nos últimos anos, tão fatídicos e desesperadores. Sei que sem a ajuda de vocês muita coisa não seria possível, e o caminho seria infinitamente mais difícil, e eu com certeza absoluta não resistiria... sem qualquer sombra de dúvidas! Posso brincar dizendo que não sei o que seria de vocês sem mim, mas também não faço ideia do que seria de mim sem vocês. Obrigada pela vida e, principalmente, pela criação. Diria que muito de mim é por minha causa, mas sei que eu não seria tudo que sou se não fosse por vocês e todos os ensinamentos e valores transmitidos. Meu mais eterno e mais sincero agradecimento!

E por último, mas com certeza não menos importante, ao meu eterno companheiro Diego Rocha Linares, que é a pessoa mais paciente que já conheci. Quase metade da minha vida passei ao seu lado, todas as minhas conquistas são na verdade nossas. Obrigada por me incentivar tanto e por entender que algumas ausências foram por um motivo maior. Obrigada por garantir que eu nunca desista dos meus sonhos. Obrigada por garantir que eu sempre tenha liberdade para ir aonde eu quiser e for preciso para conseguir atingir algum objetivo. Obrigada por me apoiar. Obrigada por me consolar. Obrigada por me aconselhar. Obrigada por me ajudar sempre que preciso criar uma imagem ou um esquema. Por falar nisso, obrigada por entender meus esquemas, ou pelo menos entender que eu tenho todo um esquema. Obrigada por me divertir tanto, mas tanto!... Obrigada por me amar, me cuidar. Obrigada por ser simplesmente você e por ter esse dom mais que especial que é aturar e respeitar minhas “não-convencionalidades”. Você é o grande exemplo de parceiro que a vida me presenteou! Não somos constantes, vivemos mudando, graças a Deus! E sou muito grata por você mudar e crescer junto comigo, de modo que mesmo depois desse tempo todo a gente continua se bastando. Não posso te afirmar que esse será o último grande desafio da minha vida, mas tem grande chance de ter sido o último mais impactante. Não sei se ainda tenho crédito para você acreditar nisso, mas obrigada por não desistir e ainda assim continuar me incentivando. Obrigada por me ajudar a ser uma pessoa melhor, mesmo eu ainda tendo um longo caminho pela frente. Poderia ter dedicado a tese a você, mas acho que não faria sentido. Prefiro dedicar o resto da minha vida... Definitivamente, de sempre e para sempre!



“De suas palavras levaram só as letras, pois a alma é só sua e não há como tirar. Eles podem levar tudo, mas sua alma, essa nunca faltará.” (Palmira Margarida)

“Muitas pessoas dizem que é o intelecto que faz um grande cientista. Estão erradas: é o caráter.”  
(Albert Einstein)

*"And I try, oh, my God, do I try / I try all the time / In this institution / And I pray, oh, my God, do I pray / I pray every single day / For a REVOLUTION" (What's Up, 4 Non Blondes)*



## Resumo

Alexandre, Verônica Marinho Fontes. **Efeito de biossurfactantes na redução da geração de biomassa em sistemas de lodos ativados**. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, D.Sc.). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Biossurfactantes apresentam atividade antimicrobiana comprovada sobre diversos microrganismos e, portanto, potencial como agentes inibidores do crescimento em sistemas de lodos ativados, minimizando a geração de biomassa e o descarte de excesso de lodo. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo (RL) sobre a geração de biomassa em sistemas de lodos ativados. Em teste rápido, utilizando meio (TSB) e inóculo (Polyseed) comerciais, 9 e 12 mg RL/L reduziram  $Y_{X/S}$  em 72% e 92%, respectivamente, sem prejuízo significativo na remoção de substrato, mas com resultados muito variáveis. Em teste rápido utilizando lodo ativado como inóculo, verificou-se que a condição inicial exerce grande influência no resultado obtido. Valores reduzidos de  $S_0/X_0$  (0,12 g DQO/g SST) não permitem o crescimento microbiano e a renovação celular na presença de RL. A melhor condição foi com 1,06 g DQO/g SST e 25 mg RL/L ou 25 mg RL/g SST, quando se observou 50-75% de redução em  $Y_{X/S}$ , e  $k$  e  $SOUR_{ex}$  muito próximos do reator Controle (sem adição de RL). Os resultados também foram influenciados por variações não identificadas no estado fisiológico do inóculo, sendo posteriormente observada redução de  $Y_{X/S}$  de apenas 20% na mesma condição. Em lodos ativados operando em bateladas sequenciais com TRH 5,5 h, TRS 20 d, efluente e lodo de indústria, obteve-se 41-52% de redução no descarte de lodo com adição de 50 mg RL/L ou 25 mg RL/g SST. Contudo, a variabilidade em diferentes condições de operação foi muito elevada, observando-se até aumento do descarte de lodo. A influência do TRS foi avaliada em operação com TRH 5,5 h, meio sintético, lodo de esgoto e 1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/L e 17-20 mg RL/g SST, não se observando redução do descarte com TRS 10 d e 27% de redução com TRS 30 d. Em geral, a adição de RL reduziu os valores de IVL do lodo, melhorando a sedimentação. Deste modo, pode-se concluir que o biossurfactante do tipo ramnolipídeo pode reduzir a geração de biomassa em sistemas de lodos ativados, porém seu efeito é dependente do grau de pureza do produto, da relação produto/biomassa, da concentração de RL no meio, da relação  $S_0/X_0$ , e do inóculo utilizado, bem como seu estado fisiológico. Mais estudos são necessários para estabelecer as condições exatas de aplicação, reduzir a variação dos resultados obtidos e consolidar a eficácia do produto.

Palavras-chave: redução de lodo; lodos ativados; biossurfactante; ramnolipídeo.





## Abstract

Alexandre, Verônica Marinho Fontes. **Effect of biosurfactants on the reduction of biomass generation in activated sludge systems.** Thesis (Doctorate in Engineering of Chemical and Biochemical Processes, D.Sc.). School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Biosurfactants have antimicrobial activity proven on different microorganisms and, therefore, show potential as growth inhibitors in activated sludge systems, minimizing biomass generation and the disposal of excess sludge. This study aimed to evaluate the effect of biosurfactants of the rhamnolipid type (RL) on the generation of biomass in activated sludge systems. In a rapid test using commercial media (TSB) and inoculum (Polyseed), 9 and 12 mg RL/L reduced  $Y_{X/S}$  by 72% and 92%, respectively, without significant loss of substrate removal, but with high variability. In a rapid test using activated sludge as inoculum, initial condition exerted a great influence on the results obtained. Reduced values of  $S_0/X_0$  (0.12 g COD/g TSS) do not allow microbial growth and renewal in the presence of RL. The best condition was 1.06 g COD/g TSS and 25 mg RL/L or 25 mg RL/g TSS, when a reduction of 50-75% in  $Y_{X/S}$ , and  $k$  and  $SOUR_{ex}$  values were close to the Control reactor (without addition of RL) were observed. Results were also affected by unidentified variations in the physiological state of the inoculum, after which a reduction of  $Y_{X/S}$  of only 20% in the same condition was observed. In activated sludge systems operating in sequential batches with HRT 5.5 h, SRT 20 d, industrial wastewater and sludge, 41-52% reduction of sludge disposal was observed when 50 mg RL/L or 25 mg RL/g TSS was added. However, the variability in different operating conditions was very high, even with increased sludge disposal. The influence of SRT was evaluated in HRT 5.5 h, synthetic medium, sewage sludge and 1.06 g COD/g TSS, 25 mg RL/L and 17-20 mg RL/g TSS, with no reduction in sludge disposal with SRT 10 d and 27% reduction in sludge disposal with SRT 30 d. In general, the addition of RL reduced SVI values, improving sedimentation. Thus, it can be concluded that the biosurfactant of the rhamnolipid type can reduce the biomass generation in activated sludge systems, but its effect is dependent on product purity, product/biomass ratio, RL concentration in the medium,  $S_0/X_0$  ratio, and of the inoculum used, as well as its physiological state. More studies are needed to establish the exact conditions for the application, to reduce the variability and consolidate the effectiveness of the product.

Keywords: sludge reduction; activated sludge; biosurfactant; rhamnolipids.



## Lista de Figuras

Figura 1 – Sistema de lodos ativados. ....	30
Figura 2 – Estratégias para gerenciamento de lodo. ....	32
Figura 3 – Estrutura química de diferentes congêneres de ramnolípídeo. ....	35
Figura 4 – Aspecto visual de sistema de lodos ativados de bancada operando com efluente sintético (A) e efluente real de refinaria de petróleo (B). ....	45
Figura 5 – Crescimento celular do inóculo (A) e de um teste rápido - Controle (B). ....	49
Figura 6 – Efeito da concentração de ramnolípídeos sobre a variação das concentrações de biomassa e substrato e do coeficiente de rendimento de um consórcio microbiano padrão. ....	52
Figura 7 – Avaliação das respostas obtidas com a adição de 9 mg RL/L (diferentes lotes) em experimentos de curta duração. ....	56
Figura 8 – Efeito da concentração de ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com mistura de efluentes de refinaria de petróleo e sintético. ....	67
Figura 9 – Correlações observadas no biorreator Teste. ....	70
Figura 10 – Correlações observadas no levantamento bibliográfico sobre adição de dnP em lodos ativados. ....	75
Figura 11 – Variação da concentração de SST com o tempo após suspensão da adição de RL em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo. ....	78
Figura 12 – Variação da concentração de SST com o tempo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo. ....	80
Figura 13 – Correlações observadas na condução de lodos ativados em bateladas sequenciais. ....	83
Figura 14 – Fluxograma do teste rápido Tipo III. ....	90
Figura 15 – Etapas realizadas para avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres de RL no teste rápido. ....	92
Figura 16 – Cinética de degradação de substrato após ativação da biomassa por 23 h. ....	96
Figura 17 – Avaliação dos Controles avaliados no DFC. ....	98
Figura 18 – Superfícies de resposta do DFC. ....	101
Figura 19 – Avaliação de discrepâncias obtidas nos resultados da Etapa 2. ....	107
Figura 20 – Efeito da concentração de RL na redução do crescimento. ....	109
Figura 21 – Efeito da adição biossurfactante do tipo ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com diferentes TRS. ....	117
Figura 22 – Zona de inibição do RL com lodos ativados. ....	128
Figura 23 – Adição de 50 mg RL/L em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo. ....	153
Figura 24 – Relação entre concentração de SST e redução de DQO em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo. ....	154
Figura 25 – Efeito do ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bateladas sequenciais de bancada sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo. ....	156
Figura 26 – Cinética de produção de biomassa e RL nas fermentações de produção dos lotes 10 e 11. ....	159
Figura 27 – Efeito do ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bateladas sequenciais de bancada sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo. ....	161



## Lista de Quadros

Quadro 1 – Proposta para comprovação das hipóteses. ....	38
Quadro 2 – Testes disponíveis para avaliação do efeito de um determinado produto no crescimento celular. ....	44



## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo utilizados na produção de biossurfactante do tipo ramnolipídeo. ....	40
Tabela 2 – Caracterização dos lotes de biossurfactante produzidos em laboratório. ....	41
Tabela 3 – Características dos produtos comerciais utilizados. ....	42
Tabela 4 – Comparação das concentrações de carbono obtidas neste estudo com a literatura. ....	48
Tabela 5 – Estatística descritiva dos experimentos Controle. ....	50
Tabela 6 – Efeito da concentração de ramnolipídeo sobre a variação de concentrações de biomassa e substrato e do coeficiente de rendimento de um consórcio microbiano padrão. ....	51
Tabela 7 – Avaliação de diferentes lotes de biossurfactante do tipo ramnolipídeo em teste rápido. ....	54
Tabela 8 – Avaliação do inóculo (14 h de crescimento) utilizado e respostas no teste rápido. ....	57
Tabela 9 – Avaliação de biossurfactante do tipo ramnolipídeo purificado em experimentos de curta duração. ....	58
Tabela 10 – Composição da alimentação dos biorreatores de bancada. ....	63
Tabela 11 – Composição do efluente sintético utilizado no preparo da alimentação dos biorreatores. ....	63
Tabela 12 – Efeito da concentração de biossurfactante do tipo ramnolipídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com mistura de efluentes de refinaria de petróleo e sintético. ....	65
Tabela 13 – Levantamento bibliográfico sobre adição de 2,4-dinitrofenol em lodos ativados. ....	74
Tabela 14 – Principais resultados da adição de ramnolipídeo em lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais. ....	77
Tabela 15 – Atividade antibacteriana de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo. ....	88
Tabela 16 – Valores reais e codificados das variáveis usadas no planejamento de experimentos. ....	93
Tabela 17 – Condições experimentais do DFC. ....	93
Tabela 18 – Condições avaliadas na Etapa 2. ....	94
Tabela 19 – Varredura de concentrações de dnP em teste rápido. ....	96
Tabela 20 – Resultados obtidos no DFC. ....	99
Tabela 21 – ANOVA do DFC. ....	100
Tabela 22 – Análise de regressão do DFC. ....	100
Tabela 23 – Estimativa da taxa de consumo de TSB e RL a partir da SOUR. ....	103
Tabela 24 – Resultado dos Controles na Etapa 2. ....	104
Tabela 25 – Resultados obtidos na validação do modelo gerado no DFC. ....	106
Tabela 26 – Avaliação da redução do volume útil no teste rápido. ....	110
Tabela 27 – Efeito de diferentes congêneres de RL no crescimento microbiano (Etapa 3). ....	110
Tabela 28 – Efeito da adição biossurfactante do tipo ramnolipídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com diferentes TRS. ....	115
Tabela 29 – Taxa de consumo de oxigênio do lodo em função da adição de produto e do TRS dos biorreatores. ....	120
Tabela 30 – Adição de 50 mg RL/L em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo. ....	152
Tabela 31 – Efeito do ramnolipídeo em sistema de lodos ativados bateladas sequenciais de bancada operando sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo. ....	157
Tabela 32 – Adição de RL em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo. ....	163





## Lista de Abreviaturas e Siglas

[RL]	Concentração de ramnolipídeos (mg RL/L)
ANOVA	Análise de variância
C-inorg	Carbono inorgânico
CMC	Concentração micelar crítica
CMI	Concentração mínima inibitória
Controle	Condição avaliada sem adição de produto, como valor de referência
C-org	Carbono orgânico
COV	Carga orgânica volumétrica (kg DBO/m <sup>3</sup> .d)
C-total	Carbono total
D.O.	Densidade óptica
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)
DCCR	Delineamento composto central rotacional
DFC	Delineamento de face centrada
dnP	2,4-dinitrofenol
DP	Desvio padrão
DQO	Demanda química de oxigênio (mg O <sub>2</sub> /L)
DRL	di-ramnolipídeo
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
ETDI	Estação(ões) de tratamento de despejos industriais
ETE	Estação(ões) de tratamento de esgoto
F/M	Relação alimento/biomassa ( <i>food/microorganism</i> )
IC	Intervalo de confiança
IVL	Índice volumétrico de lodo (mL/g)
k	Constante de degradação do substrato (h <sup>-1</sup> )
LB-EPS	Substâncias poliméricas extracelulares fracamente ligadas
MBAS	Substâncias ativas ao azul de metileno, do inglês <i>methylene blue active substance</i>
MRL	mono-ramnolipídeo
MSP	<i>Mineral salt phosphate medium</i>
OD	Oxigênio dissolvido (mg O <sub>2</sub> /L)
PNRS	Política Nacional de Resíduos Sólidos
RBS	Reator em bateladas sequenciais
RL	Ramnolipídeo
S <sub>i</sub>	Concentração de substrato no tempo i (mg C-org ou DQO/L)
SOUR	Taxa específica de consumo de oxigênio, do inglês <i>specific oxygen uptake rate</i>
SOUR <sub>ex</sub>	Taxa específica de consumo de oxigênio exógena
SQ	Soma de quadrados

SST	Sólidos suspensos totais (mg/L)
SSV	Sólidos suspensos voláteis (mg/L)
TB-EPS	Substâncias poliméricas extracelulares fortemente ligadas
Teste	Condição avaliada com adição de produto
TRH	Tempo de retenção hidráulica (h)
TRS	Tempo de retenção de sólidos (d)
TS	Tensão superficial (mN/m)
TSB	<i>Tryptic soy broth</i> (meio comercial)
UFC	Unidades formadoras de colônia
$X_i$	Concentração de biomassa no tempo $i$ (mg C-org ou SST/L)
YPDA	<i>Yeast extract, peptone, dextrose, agar</i>
$Y_{X/S}$	Coefficiente de rendimento celular (g C-org/g C-org ou g SST/g DQO)
ZOI	Zona de inibição do crescimento, do inglês <i>zone of inhibition</i>

## Sumário

1	Contextualização .....	29
2	Premissa, hipóteses e objetivos .....	37
3	Produção e caracterização de diferentes lotes de biossurfactante do tipo ramnolipídeo .....	39
3.1	Produção de ramnolipídeos em laboratório .....	39
3.2	Caracterização dos lotes de ramnolipídeos produzidos em laboratório .....	40
3.3	Caracterização de ramnolipídeos comerciais .....	41
4	Implementação de teste rápido para avaliação do efeito de biossurfactante do tipo ramnolipídeo sobre o crescimento microbiano.....	43
4.1	Introdução.....	43
4.2	Procedimento experimental .....	46
4.3	Resultados e discussão .....	47
4.3.1	Determinação da condição experimental.....	47
4.3.2	Avaliação estatística dos experimentos Controle .....	49
4.3.3	Efeito de diferentes concentrações de ramnolipídeo sobre o crescimento e consumo de substrato.....	51
4.3.4	Reprodutibilidade de resultados na aplicação de ramnolipídeo em teste rápido .....	54
4.4	Conclusões.....	59
5	Efeito de biossurfactante do tipo ramnolipídeo em sistemas de lodos ativados.....	61
5.1	Introdução.....	61
5.2	Procedimento experimental .....	62
5.3	Resultados e discussão .....	64
5.4	Conclusões.....	71
6	Variabilidade de resultados obtidos com adição de ramnolipídeo em sistemas de lodos ativados em bateladas sequenciais.....	73
6.1	Introdução.....	73
6.2	Metodologia.....	76
6.3	Resultados e discussão .....	76

6.4 Comparação de todas as operações em sistema de lodos ativados .....	82
6.5 Conclusões .....	85
7 Efeito de diferentes congêneres de ramnolípídeo sobre o metabolismo microbiano.....	87
7.1 Introdução .....	87
7.2 Procedimento experimental.....	89
7.2.1 Procedimento 1 .....	91
7.2.2 Procedimento 2 .....	91
7.2.2.1 Determinação da melhor condição do teste rápido (Etapa 1) .....	92
7.2.2.2 Validação da melhor condição do teste rápido (Etapa 2).....	94
7.2.2.3 Avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres (Etapa 3).....	94
7.2.3 Estimativa da taxa de consumo de TSB e RL a partir de SOUR.....	95
7.3 Resultados e discussão .....	95
7.3.1 Procedimento 1 .....	95
7.3.2 Procedimento 2 .....	97
7.3.2.1 Determinação da melhor condição do teste rápido (Etapa 1) .....	97
7.3.2.2 Validação da melhor condição do teste rápido (Etapa 2).....	104
7.3.2.3 Avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres (Etapa 3).....	109
7.4 Conclusões .....	111
8 Efeito do TRS de sistemas de lodos ativados no resultado da adição de biossurfactante do tipo ramnolípídeo .....	113
8.1 Introdução .....	113
8.2 Procedimento experimental.....	113
8.3 Resultados e discussão .....	114
8.4 Conclusões .....	121
9 Conclusões .....	123
10 Outros experimentos e considerações finais .....	125
Referências.....	133

Apêndice A – Métodos analíticos e análise de dados.....	143
A.1 Métodos analíticos .....	143
A.1.1 Produção e caracterização de ramnolipídeos .....	143
A.1.2 Carbono .....	143
A.1.3 Turbidez e D.O. ....	144
A.1.4 pH .....	144
A.1.5 DQO.....	145
A.1.6 Sólidos suspensos .....	145
A.1.7 Sólidos totais.....	146
A.1.8 IVL.....	146
A.1.9 OD .....	147
A.1.10 Determinação de k .....	147
A.1.11 SOUR.....	147
A.1.12 EPS .....	148
A.1.13 Resistência específica à filtração e tempo de filtração do lodo .....	148
A.2 Análise de dados .....	149
A.2.1 Redução de DQO.....	149
A.2.2 Descarte de lodo .....	150
A.2.3 Análise estatística .....	150
Apêndice B – Resultados da operação de RBS de bancada (Operação 2, item 6) .....	151
Apêndice C – Resultados da operação de RBS de bancada (Operação 3, item 6) .....	155
Apêndice D – Resultados da operação de RBS de bancada (Operação 4, item 6) .....	159



## 1 Contextualização

O tratamento biológico de efluentes pode ser considerado a principal etapa no tratamento de muitos efluentes domésticos e industriais (PAUL e LIU, 2012), pois garante a remoção de matéria orgânica biodegradável, responsável pela depleção de oxigênio dissolvido nos corpos receptores (VON SPERLING, 2007a). Processos biológicos normalmente apresentam custos menores que os físico-químicos (EBRAHIMI *et al.*, 2016; VENDRAMEL *et al.*, 2015). No entanto, ao utilizarem a matéria orgânica dos efluentes como substrato, as células microbianas se reproduzem e, para manter o equilíbrio do sistema biológico, deve-se retirar aproximadamente a mesma quantidade de biomassa gerada pelo crescimento, o que constitui o chamado excesso de lodo (ORHON, BABUNA E KARAHAN, 2009). A produção de lodo é bastante variável e diferentes tecnologias utilizadas no tratamento de efluentes e esgotos, como lodos ativados, lagoas e filtros biológicos, geram diferentes quantidades de lodo, podendo-se encontrar valores que variam de 60 a 120 g SST<sup>1</sup>/m<sup>3</sup> de efluente (METCALF & EDDY, 2016) ou 0,06 a 0,80 kg SST/kg DQO<sup>2</sup> aplicada (ANDREOLI, VON SPERLING E FERNANDES, 2007).

Atualmente, a geração de lodo representa um dos principais problemas ambientais e econômicos nas estações de tratamento de esgotos e efluentes (METCALF & EDDY, 2016; MURRAY; HORVATH; NELSON, 2008; PASDA *et al.*, 2006; SYED-HASSAN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017), por isso pode ser considerada uma das principais desvantagens de sistemas com elevado crescimento microbiano. O gerenciamento do lodo produzido, portanto, deve ser feito de forma apropriada para que todas as vantagens decorrentes do tratamento de efluentes sejam atingidas, sem gerar impactos ambientais e sociais negativos (ANDREOLI, VON SPERLING E FERNANDES, 2007; FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010; LEBLANC, MATTHEWS E RICHARD, 2008).

Dentre as tecnologias disponíveis para tratamento biológico de efluentes, o sistema de lodos ativados (Figura 1) é muito utilizado porque apresenta elevada eficiência de remoção de matéria orgânica (85-98% de redução de DBO<sup>3</sup>) e grande versatilidade em função de suas diversas variantes (VON SPERLING, 2007a; b). Avaliando dados de 166 Estações de Tratamento de Despejos Industriais (ETDI), von Sperling e Oliveira (2009) observaram que os sistemas de lodos ativados apresentam melhor desempenho, tanto em termos de qualidade do efluente

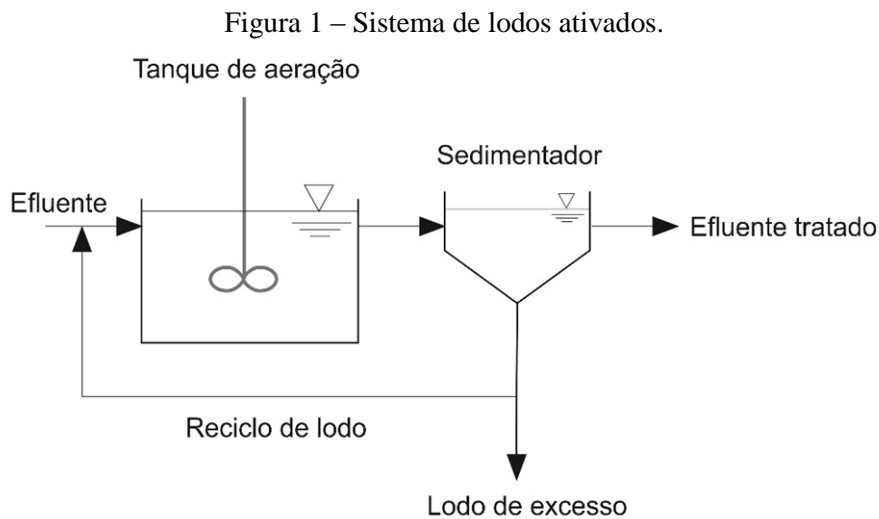
---

<sup>1</sup> SST: sólidos suspensos totais.

<sup>2</sup> DQO: demanda química de oxigênio.

<sup>3</sup> DBO: demanda bioquímica de oxigênio.

tratado (DBO média 28 mg/L) quanto em relação às remoções atingidas (redução média de DBO 85%).



Fonte: adaptado de Metcalf & Eddy (2016).

Em lodos ativados, a produção de lodo pode chegar a 800 kg SST/t DQO aplicada em sistemas convencionais (lodos primário e secundário) e 500 kg SST/t DQO aplicada em sistemas com aeração prolongada (ANDREOLI, VON SPERLING E FERNANDES, 2007). Apesar de o volume de lodo gerado ser pequeno em relação ao volume de efluente tratado (aproximadamente 1%), é o subproduto mais significativo do processo e seu gerenciamento pode corresponder a mais da metade do custo de operação da planta, variando de 350 a 750 EUR/t SST (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010; GINESTET, 2007; KACPRZAK *et al.*, 2017).

No Brasil, o gerenciamento de lodo nas estações de tratamento foi negligenciado por muito tempo, não sendo incorporado no projeto inicial, nas etapas de licenciamento e nem mesmo na operação, fazendo com que um subproduto inevitável do processo fosse tratado como uma situação de emergência (LEBLANC, MATTHEWS E RICHARD, 2008). O tratamento ainda insuficiente dos efluentes, o baixo custo da disposição de resíduos em aterros sanitários e industriais e a ausência de uma legislação efetiva contribuíram para que o problema não fosse visto com tanta gravidade quanto no restante do mundo.

Nos países desenvolvidos, grande parte dos problemas relacionados ao saneamento já foi solucionada, o que não representa a nossa realidade (PLANSAB, 2014). Apesar de estar no caminho para atender à Meta de Desenvolvimento do Milênio estabelecida pela Organização das Nações Unidas (WHO e UNICEF, 2014), dados de 2014 mostram que somente 49,8% do esgoto gerado no país é coletado e 40,8% é tratado (SNIS, 2016). Desde 2003, os investimentos



no setor de saneamento vêm aumentando, principalmente no que diz respeito à coleta e ao tratamento de esgotos, representando 46% do total investido no setor em 2014 (PLANSAB, 2014; SNIS, 2016). Entre 2010 e 2014, a cidade de João Pessoa (PB), por exemplo, aumentou sua capacidade de tratamento em 21,8%, sendo a capital brasileira que mais se destacou neste quesito (OLIVEIRA, SCAZUFCA E PIRES, 2016). Com o aumento do volume de esgoto tratado, a produção de lodo no país irá aumentar, contribuindo para a importância de estudos que visem à resolução dos problemas decorrentes da geração deste resíduo.

No estado do Rio de Janeiro, a produção de lodo nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) é estimada em 365 t/d (ZVEIBIL, 2013). Porém, o tratamento biológico de efluentes industriais também gera quantidade significativa de lodo que, além do tipo de processo e das condições de operação, também será dependente da tipologia industrial (GINESTET, 2007).

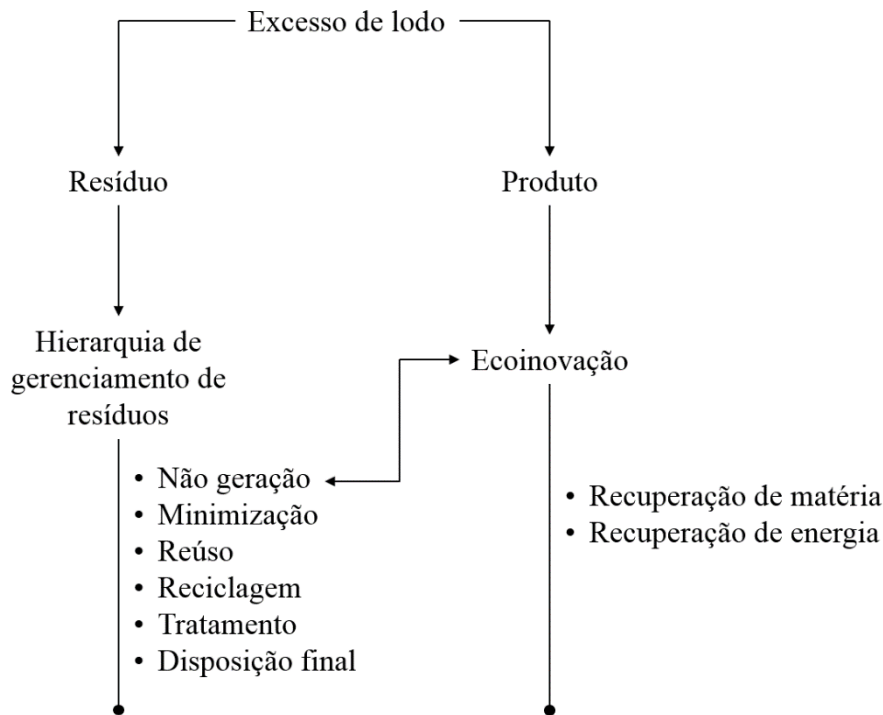
A forma como a geração e o gerenciamento de lodo são encarados no Brasil tende a mudar com a consolidação da Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS, lei nº 12.305/2010), primeira a abordar o gerenciamento de resíduos sólidos no país, após 20 anos de debates e discussões até sua aprovação. Tradicionalmente, o excesso de lodo gerado em decorrência do crescimento microbiano nos sistemas de lodos ativados é considerado um resíduo inevitável (PAUL E LIU, 2012) e seu gerenciamento deve seguir a legislação correspondente aos resíduos sólidos. Na União Europeia, a Diretiva 2008/98/EC tem como objetivo principal a minimização dos efeitos negativos que a geração e o gerenciamento de resíduos podem causar no ambiente e na saúde humana. Para isso, definiu a prevenção como primeira ação na hierarquia do gerenciamento de resíduos. Os objetivos da PNRS em muito se assemelham à legislação europeia, devendo-se atender à seguinte hierarquia: não geração, minimização, reúso, reciclagem, tratamento, e disposição final.

Nos últimos anos, o mundo vem observando uma mudança de paradigmas, buscando fontes de energia renovável e redução na extração de recursos naturais (e.g. fósforo). Nesse sentido, alguns resíduos antrópicos podem ser considerados resíduos positivos ou até mesmo subprodutos de um determinado processo (KACPRZAK *et al.*, 2017). Este é o caso do excesso de lodo, que pode ser considerado um subproduto dos processos de tratamento porque “é produzido como parte integral de um processo de produção” (Diretiva 2008/98/EC), ou seja, sua geração é inerente ao tratamento biológico de efluentes.

No final da década de 90, surgiu o conceito de ecoinovação, que prioriza o desenvolvimento de novos produtos e processos com menores impactos ambientais, porém ainda com valor

comercial (JAMES, 1997). Quando o excesso de lodo é visto como um subproduto, a hierarquia do gerenciamento de resíduos não mais se aplica, uma vez que não é mais encarado como um resíduo. Deve-se, então, seguir na linha de ecoinovação, com o objetivo de aproveitar seu potencial para recuperação de matéria ou energia (KACPRZAK *et al.*, 2017). A Figura 2 apresenta as estratégias disponíveis para o gerenciamento de lodo.

Figura 2 – Estratégias para gerenciamento de lodo.



Fonte: elaboração própria.

Dentre as opções disponíveis para recuperação do teor material e energético do lodo, as mais comuns, principalmente na Europa, são reciclagem agrícola e incineração, respectivamente (KACPRZAK *et al.*, 2017). No caso da incineração visando à recuperação energética, a umidade do lodo exerce grande influência no processo. A etapa de deságue deve ser muito eficiente, e mesmo assim, em alguns casos, o balanço energético ainda pode se mostrar negativo (ANDREOLI, VON SPERLING E FERNANDES, 2007). No Brasil, assim como na América Latina em geral, esta não é uma prática muito comum porque apresenta custos elevados e necessita mão de obra especializada (GONZÁLEZ MARTÍNEZ, BRÄUTIGAM E SEIFERT, 2012). Conseqüentemente, não há um número elevado de incineradores no país e, dentre os existentes, nem todos operam com recuperação energética. Assim, a distância entre os pontos de geração e incineração de lodo se torna limitante, aumentando os custos e as emissões secundárias em decorrência do transporte (GONZÁLEZ MARTÍNEZ; BRÄUTIGAM; SEIFERT, 2012; METCALF & EDDY, 2016).

A reciclagem agrícola do lodo de esgoto consiste em sua aplicação no solo para aproveitar seu potencial fertilizante, principalmente em decorrência dos elevados teores de nitrogênio e fósforo (ANDREOLI; VON SPERLING; FERNANDES, 2007; METCALF & EDDY, 2016). Para garantir a segurança e o mínimo de impactos ambientais, a concentração de contaminantes não pode ultrapassar a recomendada na legislação vigente. Na Europa, desde a década de 80, o uso de lodo de esgoto na agricultura está regulamentado através da Diretiva 86/278/EEC. No Brasil, a legislação vigente é de 2006 (Resolução CONAMA nº 375). Ambas restringem as concentrações de organismos patogênicos e metais tóxicos no lodo, bem como a quantidade aplicada no solo em um determinado período de tempo. No entanto, não levam em consideração poluentes emergentes, como antibióticos e hormônios, que podem estar presentes no lodo de esgoto (ZHANG *et al.*, 2017). Por isso, alguns países vêm considerando o risco ambiental associado a esta técnica. A Suíça, por exemplo, proibiu esta prática em 2005 (KACPRZAK *et al.*, 2017).

Mesmo a reciclagem agrícola de lodo de esgoto sendo uma prática legislada no Brasil, deve-se fazer ressalvas. Algumas estações de tratamento de esgoto também recebem efluentes industriais, o que pode transferir contaminantes indesejáveis para o lodo e, conseqüentemente, para o ambiente (PASDA *et al.*, 2006). O despejo não licenciado de efluentes industriais nos sistemas de esgoto pode, portanto, representar um risco ambiental ainda maior para esta prática.

Diante do exposto, a interpretação do excesso de lodo como produto não representa a estratégia ideal para o atual momento do Brasil. Em geral, o lodo é tratado para reduzir seu conteúdo de água, matéria orgânica e organismos patogênicos (VON SPERLING, 2007a) e o conjunto de operações utilizadas no seu gerenciamento apresenta elevado consumo de energia (LACROIX, ROUSSE E HAUSLER, 2014). Logo, visando à sustentabilidade das estações de tratamento de efluentes, tecnologias capazes de prevenir a geração de lodo podem ser mais adequadas. Essa estratégia atenderia aos objetivos básicos da PNRS e ainda se enquadraria na categoria deecoinovação (Figura 2), pois agregaria valor ao processo devido à redução significativa de custos e de impactos ambientais (JAMES, 1997), já que o volume de lodo a ser tratado seria reduzido.

Outra razão que torna a redução da geração de excesso de lodo uma necessidade está justamente em atender aos diferentes requisitos da PNRS. Todos os estabelecimentos que geram resíduos que não se assemelham aos resíduos sólidos domiciliares devem apresentar ao órgão ambiental responsável o seu Plano de Gerenciamento de Resíduos, o qual deve conter metas e procedimentos para a minimização da geração de resíduos sólidos.

Um fator limitante para aplicação de tecnologias que visam à minimização da geração de excesso de lodo no Brasil é o custo de disposição final em aterros, que é muito baixo (valores até 4,6 vezes mais baixos que na Europa), o que faz com que qualquer tecnologia não se equipare em termos econômicos (ALEXANDRE *et al.*, 2016; GINESTET, 2007). A PNRS proíbe a disposição de resíduos em aterros sanitários e industriais, nos quais apenas rejeitos podem ser dispostos. Lodos oriundos de estações de tratamento de efluentes não podem, na sua essência, ser considerados rejeitos, pois ainda não têm todas as possibilidades de tratamento e recuperação esgotadas. Entretanto, a PNRS estipula também que rejeitos são resíduos sem mais alternativas de tratamento economicamente viáveis, por isso aterros ainda têm permissão para realizar a disposição de lodos. Porém, a tendência é que o cenário mude ao longo dos anos, principalmente pela limitação de áreas disponíveis para construção de novos aterros, o que deve aumentar o custo da disposição final. Portanto, futuramente, a redução de lodo deve se tornar uma realidade no Brasil e, para tal, mais estudos sobre possíveis tecnologias são necessários.

Existem diversas tecnologias disponíveis para a redução do excesso de lodo, algumas avaliadas somente em escala laboratorial, outras já nas escalas piloto e industrial. No entanto, os resultados são extremamente variáveis (GINESTET, 2007; PAUL E LIU, 2012). As tecnologias disponíveis se dividem em duas categorias: integração às unidades de tratamento de lodo e integração às unidades de tratamento de efluentes (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010). Na primeira categoria reduz-se a massa de lodo encaminhada para disposição final, enquanto na segunda evita-se que o lodo seja gerado (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010), sendo considerada uma alternativa mais apropriada no contexto de desenvolvimento sustentável (ALEXANDRE *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2003) e que atende aos objetivos básicos da PNRS.

Dentre as tecnologias integradas às unidades de tratamento de efluentes, modificações relativamente simples nos sistemas de lodos ativados podem ser utilizadas para reduzir a quantidade de lodo gerado, como o emprego da variante aeração prolongada, adição de produtos (tipicamente desacopladores metabólicos) e introdução de um reator lateral anaeróbio com reciclo de lodo (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010; PAUL E LIU, 2012).

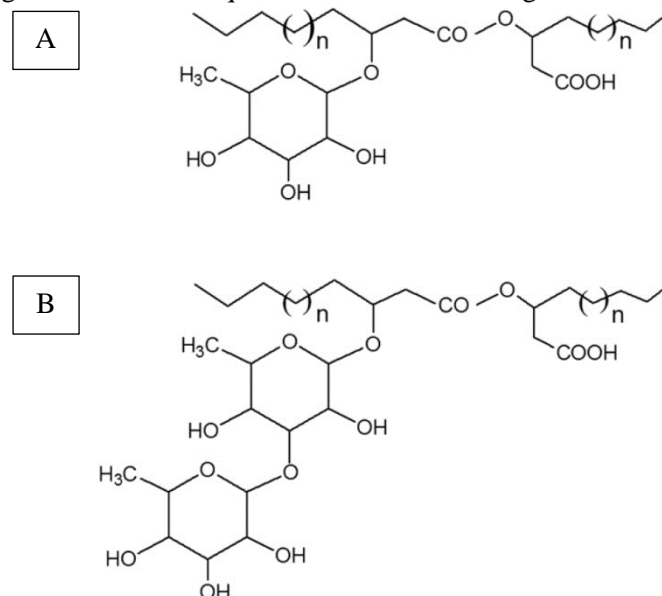
A adição de produtos para reduzir o crescimento microbiano, sem afetar a remoção de matéria orgânica, é uma tecnologia bastante atraente. Como sua implementação depende apenas da introdução de um sistema de dosagem do produto no tanque de aeração, o investimento necessário é muito baixo (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010). Em contrapartida, a adição contínua do produto pode levar à adaptação da biomassa e,

consequentemente, à perda de efeito do produto (PAUL E LIU, 2012; TIAN *et al.*, 2013). Portanto, a busca por novos produtos que permitam um efeito prolongado é extremamente necessária. Neste sentido, surge a proposta de adição de biossurfactantes diretamente no tanque de aeração de lodos ativados visando à redução da geração de biomassa.

Biossurfactantes são moléculas anfifílicas produzidas por microrganismos e que apresentam propriedades tensoativas (VARVARESOU E IAKOVOU, 2015). Há um interesse crescente nesses compostos devido às suas características de elevada biodegradabilidade, baixa ecotoxicidade, grande diversidade estrutural, produção a partir de compostos renováveis e atividade antimicrobiana (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). Já existem diversos estudos, incluindo patentes, que avaliam o efeito antimicrobiano dos biossurfactantes, porém a maior parte na área biomédica (KOSARIC E VARDAR-SUKAN, 2015).

Dentre as classes de biossurfactantes, têm-se os glicolipídeos, cujas estruturas são compostas por uma parte glicosídica e outra lipídica (KOSARIC E VARDAR-SUKAN, 2015). Nesta classe, os ramnolipídeos (RL) constituem um dos mais estudados na literatura, com estruturas moleculares contendo uma ou duas moléculas de ramnose ligadas entre si e uma ou duas cadeias de ácidos graxos (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011), conforme apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Estrutura química de diferentes congêneres de ramnolipídeo.



Fonte: Haba *et al.* (2014). (A) Mono-ramnolipídeo (MRL). (B) Di-ramnolipídeo (DRL). Sendo  $n = 4, 6$  ou  $8$ .

O maior potencial de aplicação de ramnolipídeos está na área ambiental, principalmente no que diz respeito à biorremediação de solos contaminados (RIKALOVIC, VRVIC E KARADZIC, 2015). Em relação ao tratamento de efluentes, existem diversos estudos que avaliam a adição

de ramnolipídeos visando ao aumento da absorção de compostos com características hidrofóbicas, melhorando a qualidade do efluente final (SPONZA E GÖK, 2010; UYSAL E TÜRKMAN, 2005; ZHANG *et al.*, 2009). Na revisão bibliográfica realizada, até o momento não foram encontrados estudos que avaliam a adição de (bios-)surfactantes no tanque de aeração de lodos ativados visando à redução do crescimento microbiano. Foi encontrado, contudo, um estudo que avaliou o efeito de diferentes concentrações de um surfactante químico em microrganismos de um sistema de lodos ativados operando em escala laboratorial (WYRWAS, KRUSZELNICKA E GINTER-KRAMARCZYK, 2011). Nesse estudo, concentrações de pelo menos 50 mg/L do surfactante limitaram o crescimento microbiano, porém a biota foi regenerada quando a adição do composto foi suspensa.

O Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM, IQ/UFRJ) vem desenvolvendo estudos relacionados à produção de ramnolipídeos há mais de 15 anos (SANTA ANNA *et al.*, 2001), já tendo avaliado sua produção nas escalas de bancada (KRONEMBERGER *et al.*, 2008) e piloto (KRONEMBERGER, BORGES E FREIRE, 2011). Se comprovada sua ação como agente de redução da geração de lodo, abre-se mais uma perspectiva de mercado para este bioproduto. Esta nova aplicação pode incentivar o desenvolvimento de estudos para a redução dos custos de produção de biossurfactantes, atualmente o maior gargalo para sua comercialização (KOSARIC E VARDAR-SUKAN, 2015).

## 2 Premissa, hipóteses e objetivos

Biossurfactantes apresentam atividade antimicrobiana já comprovada sobre diversos microrganismos (BALLOT, 2009; KOSARIC E VARDAR-SUKAN, 2015; LOTFABAD, SHAHCHERAGHI E SHOORAJ, 2013; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). Dentre esses, os ramnolipídeos se destacam, inibindo a formação de biofilmes e o crescimento planctônico mesmo em baixas concentrações (ARAUJO *et al.*, 2016). Como este efeito é dependente da espécie alvo (BALLOT, 2009; BENINCASA *et al.*, 2004; HABA *et al.*, 2003), a premissa utilizada nesta tese se fundamenta no fato de que algumas espécies de bactérias nos sistemas de lodos ativados podem ser mais sensíveis ao efeito antimicrobiano dos ramnolipídeos, reduzindo desta forma o descarte de lodo em decorrência do menor crescimento microbiano destas espécies. Para o desenvolvimento do estudo, algumas hipóteses foram elaboradas e comprovadas ou não, de acordo com o Quadro 1.

Deste modo, o objetivo principal do estudo é avaliar o efeito da adição de um bioproduto (biossurfactante do tipo ramnolipídeo) em sistemas de lodos ativados visando à redução de excesso de lodo. Como objetivos específicos, tem-se:

- Implementação de teste rápido para avaliar o efeito de diferentes lotes de bioproduto.
- Determinação das condições do teste rápido que levam à maior redução do crescimento microbiano.
- Avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres (MRL e DRL) do bioproduto na redução do crescimento microbiano.
- Avaliação do efeito do bioproduto na redução do descarte de lodo em lodos ativados operando em bateladas sequenciais.
- Comprovação de quais parâmetros de operação de lodos ativados têm influência no efeito do bioproduto.

Quadro 1 – Proposta para comprovação das hipóteses.

Verificação	Resultados esperados
<i>Hipótese 1: Biossurfactante do tipo ramnolipídeo reduz o crescimento celular sem causar prejuízo na remoção de substrato.</i>	
Utilização de um teste rápido com inóculo e substrato padrão para determinação de $Y_{X/S}$ <sup>(a)</sup> com diferentes concentrações de RL produzido em laboratório.	Determinação da menor concentração em que se observa redução no crescimento sem prejuízo na remoção de substrato (redução significativa em $Y_{X/S}$ ).
<i>Hipótese 2: Biossurfactante do tipo ramnolipídeo pode ser utilizado em lodos ativados para redução do excesso de lodo.</i>	
Operação de lodos ativados em bateladas sequenciais simulando condições reais de tratamento com diferentes concentrações de RL produzido em laboratório, utilizando inóculo e efluente oriundos de refinaria de petróleo.	Determinação da menor concentração de RL em que se observa redução significativa no descarte de lodo sem prejuízo na redução de DQO.
<i>Hipótese 3: Diferentes congêneres de ramnolipídeo apresentam diferentes efeitos em lodos ativados.</i>	
Utilização de um teste rápido com substrato padrão e inóculo oriundo de ETE para avaliação do efeito da concentração de ramnolipídeos comerciais (mistura de congêneres, 90% MRL e 90% DRL) <sup>(b)</sup> sob diferentes condições iniciais do teste.	Determinação da melhor condição inicial do teste para se observar a redução de crescimento com adição de RL (mistura de congêneres). Determinação da menor concentração de RL (mistura de congêneres) em que se observa redução significativa em $Y_{X/S}$ . Comparação do efeito da adição de diferentes frações de congêneres em $Y_{X/S}$ .
<i>Hipótese 4: As condições de operação de lodos ativados influenciam a resposta do ramnolipídeo.</i>	
Operação de lodos ativados em bateladas sequenciais utilizando meio sintético padrão e inóculo oriundo de ETE com diferentes TRS <sup>(c)</sup> .	Determinação do TRS em que se observa a maior redução no descarte de lodo.

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Coefficiente de rendimento celular. <sup>(b)</sup>Mono-ramnolipídeo (MRL) e di-ramnolipídeo (DRL). <sup>(c)</sup>Tempo de retenção de sólidos. <sup>(d)</sup>Sólidos suspensos voláteis.



### 3 Produção e caracterização de diferentes lotes de biossurfactante do tipo ramnolipídeo

#### 3.1 Produção de ramnolipídeos em laboratório

Para produção do biossurfactante do tipo ramnolipídeo foi utilizada a cepa *Pseudomonas aeruginosa* PA1, estocada em solução aquosa de glicerol 10%<sub>(v/v)</sub> a -80°C no LaBiM. A manutenção das células e a produção do biossurfactante seguiram metodologias descritas em Araujo (2013) e Kronemberger (2007).

O pré-inóculo foi cultivado em meio YPDA (*yeast extract, peptone, dextrose, agar*) em placas de Petri incubadas a 30°C por 48 h, sendo transferido para erlenmeyers de 1 L com 300 mL de meio MSP (*mineral salt phosphate medium*) com nutrientes. A composição dos meios de cultivo utilizados encontra-se na Tabela 1. Após 24 h de incubação em frascos agitados (170 rpm) a 30°C, o meio de cultivo contendo as células foi transferido para criotubos contendo glicerol (1 parte de glicerol : 3 partes de meio). Para cada lote de biossurfactante produzido, 1 mL do conteúdo de um criotubo era adicionado em 300 mL de meio MSP com nutrientes para o crescimento do inóculo, sendo os frascos mantidos sob agitação a 30°C e 170 rpm por 40 h. Após esse tempo, o meio era centrifugado (5000 g, 20 min), de modo que as células pudessem ser utilizadas como inóculo (1 g<sub>biomassa</sub>/L).

As fermentações foram realizadas em meio MSP, em frascos agitados (erlenmeyer de 1 L com 300 mL de volume útil) a 30°C, como no crescimento do inóculo, ou em biorreator de bancada desenvolvido por Kronemberger (2007). A produção foi encerrada após 7 dias ou quando o glicerol se mostrou totalmente consumido. O caldo fermentado era autoclavado (121°C, 15 min) e centrifugado (5000 g, 20 min) para separação das células, sendo o caldo fermentado livre de células denominado ramnolipídeo bruto. Após esta etapa, o biossurfactante foi liofilizado ou purificado. Após a produção, o produto foi congelado em frascos de menor volume para prolongar o tempo de estocagem, reduzir a contaminação, e sua consequente degradação.

A purificação do biossurfactante produzido foi feita em funil de separação, adicionando-se igual volume de mistura de solventes (2 clorofórmio : 1 metanol) ao meio fermentado livre de células. A mistura foi agitada à temperatura ambiente por 5 min, seguida de repouso até a separação das fases. A fase orgânica foi removida e a operação repetida. O extrato contendo o biossurfactante foi concentrado em rota-evaporador a 45°C, e o produto viscoso e amarelado obtido dissolvido em metanol, que foi novamente evaporado em rota-evaporador. O produto purificado foi

armazenado em *freezer* e, antes da utilização, era feita uma solução aquosa deste biossurfactante na concentração de 5,0 g RL/L.

Tabela 1 – Composição dos meios de cultivo utilizados na produção de biossurfactante do tipo ramnolipídeo.

Meio	Componente	Concentração (g/L)
YPDA	Extrato de levedura	3,0
	Peptona	15,0
	Dextrose	1,0
	Agar	12,0
MSP com nutrientes	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
	NaNO <sub>3</sub>	1,0
	Peptona	5,0
	Extrato de levedura	5,0
	Glicerol P.A.	30,0
Meio MSP	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
	NaNO <sub>3</sub>	1,4 (C:N 60)
	Glicerol P.A.	30,0

Fonte: adaptado de Araujo (2013) e Kronemberger (2007).

### 3.2 Caracterização dos lotes de ramnolipídeos produzidos em laboratório

Três formas de biossurfactante do tipo ramnolipídeo produzido em laboratório foram utilizadas ao longo do estudo: RL bruto (caldo fermentado livre de células), RL liofilizado (caldo fermentado livre de células seguido de liofilização), RL purificado (caldo fermentado livre de células seguido de etapa de purificação). A caracterização dos diferentes lotes produzidos foi feita em termos de concentração de ramnolipídeos, concentração micelar crítica (CMC) e tensão superficial (TS), conforme dados apresentados na Tabela 2. Os métodos analíticos estão descritos no Apêndice A.

Algumas diferenças em relação à metodologia descrita no item 3.1 foram observadas. Três modificações puderam ser identificadas: concentração de inóculo, meio utilizado na produção e relação C:N do meio de fermentação. Outra mudança que pode ter ocorrido foi a alteração das células utilizadas. A cinética de produção do biossurfactante foi modificada com o passar do tempo e, para se atingir os rendimentos normalmente obtidos, o tempo de fermentação foi aumentado de 7 para 30 d. De modo a contornar o problema, adicionou-se 2 g/L de extrato de levedura no meio de produção.

A produção de ramnolipídeos é bastante complexa, sendo influenciada por condições ambientais, como disponibilidade de nutrientes e densidade de células, além de fatores genéticos (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). Como as condições de fermentação e manutenção das células não foram rigorosamente respeitadas, os lotes produzidos podem ter apresentado diferentes características não quantificadas, como proporção de congêneres. Consequentemente, diferentes efeitos observados podem ser decorrentes destas alterações.

Tabela 2 – Caracterização dos lotes de biosurfactante produzidos em laboratório.

Lote	Tipo	RL (mg/L) <sup>(a)</sup>	CMC (mg/L)	TS (mN/m)
1	Purificado	5000 (orcinol)	n.a. <sup>(b)</sup>	n.a.
2	Bruto	8860 (orcinol)	118	29
3	Bruto	7940 (orcinol)	137	29
4	Bruto	10200 (orcinol)	53	29
5 <sup>(c)</sup>	Liofilizado	40% <sup>(d)</sup>	440 <sup>(e)</sup>	28 <sup>(e)</sup>
6 <sup>(f)</sup>	Bruto	6300 (orcinol)	65	n.a.
7 <sup>(g)</sup>	Bruto	4080 (HPLC)	177	29
8 <sup>(h)</sup>	Bruto	2175 (HPLC)	85	27
9 <sup>(h,i)</sup>	Bruto	951 (HPLC)	154	33
10 <sup>(j)</sup>	Bruto	5155 (HPLC)	204	29
11 <sup>(i,j)</sup>	Bruto	1200 (HPLC)	187	29
12	Bruto	5480 (HPLC)	n.a.	n.a.
13 <sup>(i)</sup>	Bruto	240 (HPLC)	n.a.	n.a.

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Considerando fator 0,4489 g ramnose/g RL. <sup>(b)</sup>n.a. = não avaliado. <sup>(c)</sup>Meio utilizado na produção de RL com relação C:N 13 e inóculo < 1 g<sub>biomassa</sub>/L. <sup>(d)</sup>Percentual por se tratar de produto sólido. O método de quantificação não foi informado. <sup>(e)</sup>Resultados do caldo fermentado livre de células, antes da liofilização. <sup>(f)</sup>Meio utilizado na produção de RL provavelmente não foi o MSP. <sup>(g)</sup>Meio utilizado na produção de RL foi o MSP com 2 g/L de extrato de levedura e concentração de inóculo < 1 g<sub>biomassa</sub>/L. <sup>(h)</sup>Meio utilizado na produção de RL foi MSP com 5,5 g/L de NaNO<sub>3</sub>, (C:N 13). <sup>(i)</sup>Produção realizada em fermentador de bancada. <sup>(j)</sup>Fermentações realizadas simultaneamente e, antes da produção, a cepa foi reativada.

### 3.3 Caracterização de ramnolipídeos comerciais

Para reduzir a variabilidade na produção de RL e nos resultados obtidos, optou-se pelo emprego de um produto comercial em função do conhecimento da composição das frações constituintes, mas, principalmente, em função do elevado teor de pureza. Ao minimizar a presença de diferentes substâncias no produto utilizado, o efeito do RL se torna mais evidente. Foram utilizados três produtos da empresa Agae Technologies (<http://www.agaetech.com/>), adquiridos através da Sigma Aldrich: R90, R95M90 e R95D90. O primeiro é um sólido amarelo altamente higroscópico que forma uma solução aquosa também amarela, enquanto os outros são sólidos brancos menos higroscópicos que formam uma solução aquosa incolor. A empresa utiliza a cepa *P. aeruginosa* NY3 (RIKALOVIC, VRVIC E KARADZIC, 2015) para produção e as informações pertinentes às características se encontram na Tabela 3.

Tabela 3 – Características dos produtos comerciais utilizados.

Produto	Pureza	MRL : DRL	RL (mg/g) <sup>(a)</sup>	CMC (mg RL/L)	TS (mN/m)
R90	90% RL	≈ 3 : 2 <sup>(b)</sup>	564 (HPLC)	154	32 <sup>(c)</sup>
R95M90	95% RL 90% MRL	9 : 1	n.a. <sup>(d)</sup>	n.a.	n.a.
R95D90	95% RL 90% DRL	1 : 9	n.a.	n.a.	n.a.

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>mg RL/g seca, considerando fator 0,4489 g ramnose/g RL. <sup>(b)</sup>Informação fornecida diretamente pela empresa Agae Technologies, podendo variar ligeiramente dependendo do lote. <sup>(c)</sup>Valor referente a uma solução 0,6%<sub>(massa úmida/v)</sub>. <sup>(d)</sup>n.a. = não avaliado.

## **4 Implementação de teste rápido para avaliação do efeito de biossurfactante do tipo ramnolipídeo sobre o crescimento microbiano**

### **4.1 Introdução**

Na literatura existem diversos estudos relacionados à adição de produtos visando à redução de lodo. A maioria deles faz uso de desacopladores metabólicos, normalmente associados a moléculas com anel aromático (HOLLINGWORTH, 2001), como 2,4-dinitrofenol (dnP). Contudo, outros produtos podem ser utilizados com a mesma finalidade, como ácido fólico (produto comercial Dosfolat<sup>®</sup>, BIOFOL GmbH) e uma mistura de surfactantes químicos e proteínas de estresse extraídas de *Saccharomyces cerevisiae* (produto comercial Accell<sup>®</sup>, Advanced BioCatalytics Corporation). Ambos os produtos foram testados em trabalho anterior, apresentando resultados satisfatórios, porém variáveis (ALEXANDRE, 2013).

Substâncias químicas de baixa biodegradabilidade, como o dnP (SHE *et al.*, 2012), dificilmente perdem sua estabilidade, fazendo com que variações nos resultados obtidos a longo prazo em sistemas de lodos ativados provavelmente sejam decorrentes de adaptação do consórcio microbiano às substâncias (PAUL E LIU, 2012; TIAN *et al.*, 2013). No entanto, a perda de efeito ao longo do tempo, observada em estudo anterior com os bioprodutos Dosfolat<sup>®</sup> e Accell<sup>®</sup>, pode ter sido em decorrência não somente de alteração e/ou adaptação do consórcio, mas também da perda de atividade dos produtos (ALEXANDRE, 2013).

Biossurfactantes também podem ser empregados como agentes de redução de lodo mas, por serem moléculas biodegradáveis (KOSARIC E VARDAR-SUKAN, 2015), são instáveis e podem perder sua atividade durante a estocagem. Um teste padronizado é importante para determinar o potencial de aplicação, eficácia e reprodutibilidade de um produto com a finalidade de reduzir a produção de lodo. Na ausência deste teste padronizado, a aplicação direta em escala industrial pode não trazer os resultados esperados.

Na literatura foram encontrados três tipos de testes, simples e de curta duração (Quadro 2), para avaliar produtos capazes de alterar o metabolismo microbiano. O teste Tipo I utiliza placas de cultivo de células de 96 poços, nos quais bactérias são inoculadas em meio líquido contendo diferentes concentrações do produto a ser testado, avaliando-se o crescimento microbiano após o tempo de incubação (WIEGAND, HILPERT E HANCOCK, 2008). Por não avaliar o

consumo de substrato, o teste não seria apropriado para este estudo, pois deseja-se reduzir o crescimento sem prejuízo do consumo de matéria orgânica.

O teste Tipo II utiliza meio de cultivo e inóculo comerciais (PODELLA *ET AL.*, 2009; PODELLA E HAUPTMANN, 2004), enquanto o Tipo III utiliza inóculo proveniente de reatores de lodos ativados de laboratório com alimentação composta de efluente sintético à base de glicose, acetato de sódio e amido, com diferentes composições (CHEN, MO E LIU, 2002; CHEN *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2013; YANG, XIE E LIU, 2003). Ambos avaliam o coeficiente de rendimento celular ( $Y_{X/S}$ ), mas com métodos analíticos diferentes.

Quadro 2 – Testes disponíveis para avaliação do efeito de um determinado produto no crescimento celular.

Teste	Resposta	Referências
Tipo I	$\Delta X$ (UFC/mL ou D.O.)	Wiegand, Hilpert e Hancock (2008)
Tipo II	$Y_{X/S}$ (mg C-org/mg C-org)	Podella e Hauptmann (2004); Podella <i>et al.</i> (2009)
Tipo III	$Y_{X/S}$ (mg SST/mg DQO)	Chen, Mo e Liu (2002); Chen <i>et al.</i> (2006); Fang <i>et al.</i> (2015); Feng <i>et al.</i> (2013); Tian <i>et al.</i> (2013); Yang, Xie e Liu (2003)

Fonte: elaboração própria. UFC: unidades formadoras de colônia; D.O.: densidade óptica; C-org: carbono orgânico.

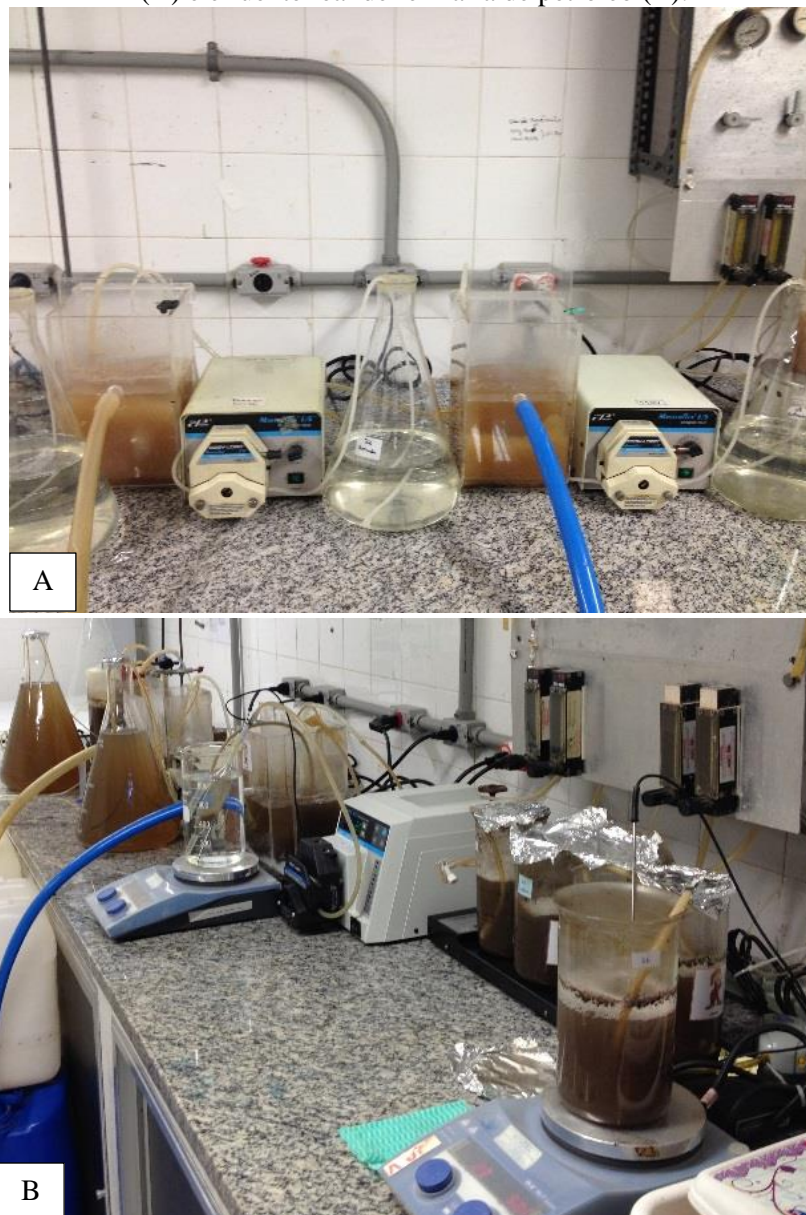
A principal fonte de energia dos microrganismos nos sistemas de tratamento de efluentes são os compostos de carbono, o que faz com que as características da população predominante sejam altamente dependentes do tipo e da concentração destes compostos no efluente (EIKELBOOM, 2000). A operação de um sistema de lodos ativados com efluente sintético leva a variações significativas no consórcio microbiano, que podem ser observadas até mesmo visualmente. A Figura 4 apresenta dois sistemas operados em laboratório, um com efluente sintético (composição simulando efluente de refinaria de petróleo, adaptada de Brookes, 2005) e outro com efluente real oriundo de refinaria de petróleo. Quando os flocos de lodo se desenvolvem bem, apresentam coloração marrom (EPA, 1997). O efluente sintético proporciona uma seleção dos microrganismos, que foi visualmente percebida pela alteração de sua coloração marrom característica. Como resultado desta alteração, o lodo pode apresentar problemas de sedimentação, tornando praticamente impossível a operação em modo contínuo, conforme foi observado experimentalmente.

A implementação do teste Tipo III, que utiliza inóculo proveniente de reatores de bancada mantidos com efluente sintético, permitiria a modificação das características das células ao longo do tempo, podendo levar a resultados diferentes e não necessariamente atribuídos ao

produto avaliado. Ao se utilizar inóculo comercial padrão, as variações são reduzidas, e por isso deu-se preferência ao teste Tipo II.

Deste modo, o objetivo inicial desta etapa do estudo foi implementar uma metodologia padronizada (Teste Tipo II, Quadro 2) para verificar o efeito do biossurfactante do tipo ramnolípídeo no crescimento microbiano, determinando a concentração mínima necessária para redução significativa de  $Y_{X/S}$ .

Figura 4 – Aspecto visual de sistema de lodos ativados de bancada operando com efluente sintético (A) e efluente real de refinaria de petróleo (B).



Fonte: acervo pessoal.

## 4.2 Procedimento experimental

A metodologia utilizada nesta etapa foi adaptada de Podella et al. (2009), que desenvolveu um método de determinação do coeficiente de rendimento celular com base em análises de carbono. O método utiliza um consórcio de bactérias aeróbias empregado como “semente” na análise de DBO (Polyseed, InterLab<sup>®</sup> Supply), o que supostamente elimina variações por se tratar de um produto comercial padronizado. Como substrato, utiliza-se meio TSB (*tryptic soy broth*, Merck), de composição definida (em mg/g: 567 peptona de caseína, 100 peptona de soja, 167 NaCl, 83,3 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 83,3 glicose) e totalmente solúvel, fazendo com que todo o material particulado em suspensão seja corretamente determinado como biomassa.

Para crescimento do inóculo, o conteúdo de uma cápsula de Polyseed foi ressuspensionado em 1200 mL de água destilada, sob agitação magnética, aeração com ar difuso por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, deixava-se em repouso por 5 min para sedimentação de sólidos suspensos usados como material suporte na produção do inóculo, vertendo-se a suspensão sobrenadante para outro recipiente. O meio TSB era dissolvido nessa suspensão (3 g/L), não havendo necessidade de ajuste de pH, pois o meio apresentava valores de pH em torno de 7. A mistura (120 mL) foi transferida para erlenmeyers de 250 mL, que foram incubados em agitador orbital a 30°C/150 rpm, por 14 h. O procedimento era realizado em triplicata e, após 14 h, o conteúdo dos três frascos era misturado e utilizado como inóculo.

Para avaliação do efeito do produto, preparava-se 120 mL de uma mistura contendo 10%<sub>(v/v)</sub> de inóculo, meio TSB 3 g/L (dissolvido em água destilada) e o produto a ser testado, sendo então transferida para erlenmeyers de 250 mL. Cada condição era avaliada em triplicata, sendo o Controle referente aos frascos sem adição de produto. Os frascos eram incubados em agitador orbital a 30°C/150 rpm por 4 h.

Amostras iniciais (0 h) e finais (4 h) foram retiradas sob agitação magnética para garantir a homogeneidade devido à presença de sólidos em suspensão e foram analisadas quanto à concentração de carbono orgânico total e solúvel. Para obtenção da fração solúvel, utilizava-se membranas de celulose de 0,45 µm, imersas em 2 L água destilada por 24 h e lavadas com 100 mL de água destilada antes do uso. Para reduzir o risco de contaminação das amostras, sempre se usava membranas novas.

Toda a vidraria utilizada nos experimentos, após lavagem, foi rinsada com HNO<sub>3</sub> 20% e água destilada e a preservação das amostras foi feita com adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol/L (1 mL/100 mL amostra), seguida de congelamento. Vale ressaltar que não se trabalhou sob condições



assépticas, uma vez que o objetivo era a utilização de um método rápido e simples para avaliação do efeito do produto.

A concentração de substrato foi obtida através da análise da fração solúvel (Equação (1)), enquanto a concentração de biomassa de cada amostra era obtida através da diferença entre o C-org total e o C-org da fração solúvel (Equação (2)). O coeficiente de rendimento celular foi calculado assumindo-se que em 4 h não havia liberação de material intracelular no meio de reação, seguindo a Equação (3), com:

- $X_0$ : concentração de biomassa inicial (mg C-org/L);
- $X_4$ : concentração de biomassa após 4 h de reação (mg C-org/L);
- $S_0$ : concentração de substrato inicial (mg C-org/L), e
- $S_4$ : concentração de substrato após 4 h de reação (mg C-org/L).

$$S_i = C - org_{solúvel} \quad (1)$$

$$X_i = C - org_{total} - C - org_{solúvel} \quad (2)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_4 - X_0}{S_4 - S_0} \quad (3)$$

Foram avaliados diferentes lotes e concentrações de biossurfactante, melhor descritos nos resultados apresentados a seguir. Os métodos analíticos encontram-se descritos no Apêndice A.

## 4.3 Resultados e discussão

### 4.3.1 Determinação da condição experimental

Inicialmente, foi realizado um experimento para comparar os dados obtidos com os da metodologia descrita na literatura (PODELLA *et al.*, 2009; PODELLA E HAUPTMANN, 2004), conforme apresentado na Tabela 4. Os valores iniciais de biomassa e substrato indicam que a condição inicial descrita na literatura foi reproduzida, com baixos valores de erro (máximo 5%), coerentes com o erro da análise de carbono. Contudo, após 4 h de reação, as diferenças obtidas foram maiores, com erros de até 53%. Os experimentos da literatura foram efetuados com assepsia e em reatores com introdução de ar difuso, enquanto neste estudo

utilizaram-se frascos agitados e não se trabalhou com assepsia, de modo a simplificar o experimento. Inicialmente, o erro obtido foi atribuído a essas diferenças metodológicas, bem como possíveis variações nos lotes de meio TSB e Polyseed.

Tabela 4 – Comparação das concentrações de carbono obtidas neste estudo com a literatura.

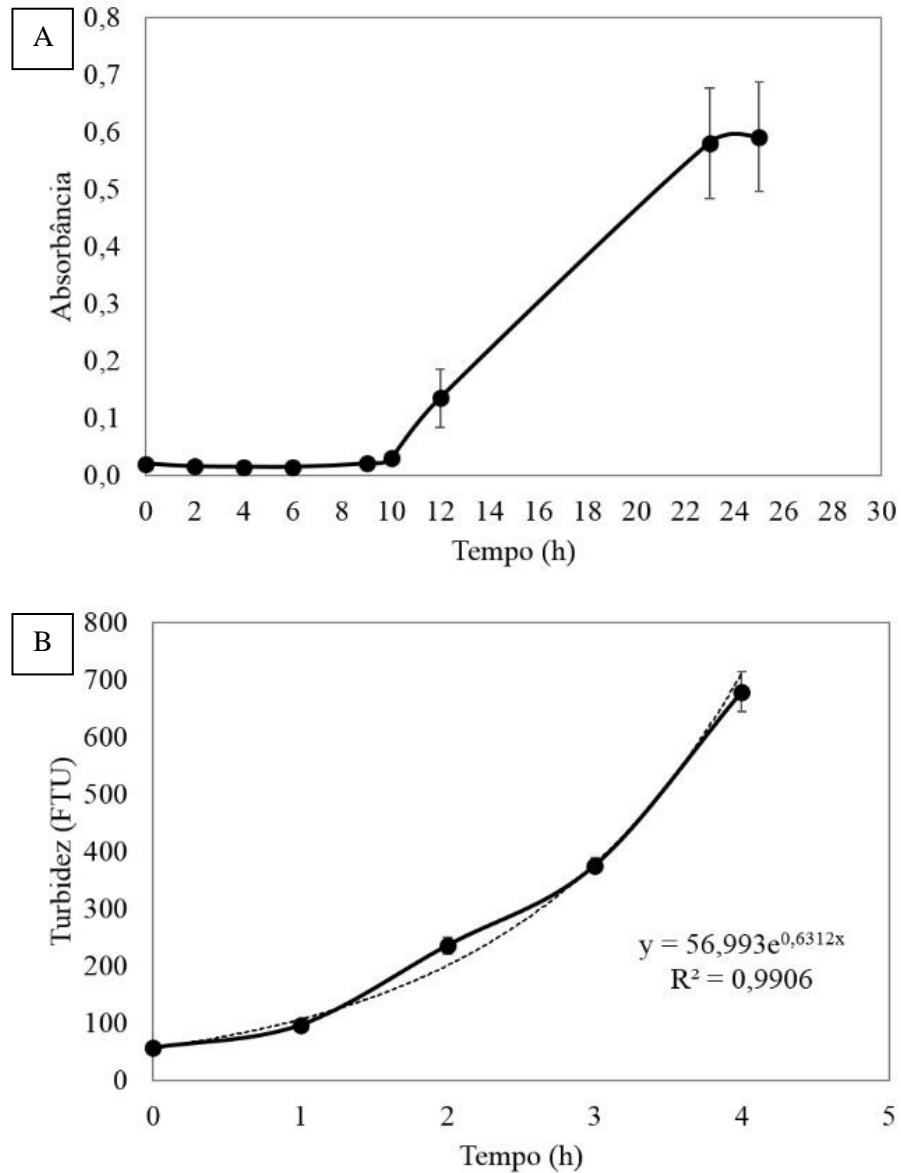
Parâmetro	Literatura <sup>(a)</sup>	Este estudo	Erro <sup>(b)</sup> (%)
X <sub>0</sub> (mg C-org/L)	81,2	78,9	-2,9
X <sub>4</sub> (mg C-org/L)	224,0	310	28
ΔX (mg C-org/L)	142,8	231	38
S <sub>0</sub> (mg C-org/L)	891,2	936	4,8
S <sub>4</sub> (mg C-org/L)	715,9	565	-27
ΔS (mg C-org/L)	175,3	371	53
Y <sub>X/S</sub>	0,815	0,623	-31

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Podella; Hauptmann (2004) e Podella et al. (2009). <sup>(b)</sup>Obtido pela diferença relativa entre os valores deste estudo e da literatura.

Os desenvolvedores do método (PODELLA *et al.*, 2009; PODELLA E HAUPTMANN, 2004) não informaram a fase de crescimento das células do inóculo. Pelo tempo de 14 h, estima-se que seja a fase exponencial de crescimento, conforme comprovado pelas curvas de crescimento apresentadas na Figura 5. As curvas apresentadas nas Figura 5A e 5B são do crescimento do inóculo e do teste propriamente dito (Controle, 4 h), respectivamente, de diferentes experimentos. A curva de crescimento do inóculo (Figura 5A) indica que em 14 h as células encontram-se no início da fase exponencial. Em 4 h de teste (Figura 5B) observa-se que as células também se encontram na fase exponencial de crescimento ( $R^2$  0,9906). Portanto, apesar de os desenvolvedores do método não informarem em que fase de crescimento se encontravam as células do inóculo, acredita-se que este não seja um fator de influência sobre os resultados obtidos, a não ser que o estado fisiológico das células estivesse alterado por outro motivo não identificado.

Os desenvolvedores do método (PODELLA *et al.*, 2009; PODELLA E HAUPTMANN, 2004) também não informam dados estatísticos, utilizando um único valor para o experimento Controle (Y<sub>X/S</sub> 0,815). Ao contrário, neste estudo diversos experimentos foram conduzidos para obtenção de resultados estatisticamente significativos, apresentados a seguir.

Figura 5 – Crescimento celular do inóculo (A) e de um teste rápido - Controle (B).



Fonte: elaboração própria. A linha pontilhada em (B) refere-se à linha de tendência exponencial.

#### 4.3.2 Avaliação estatística dos experimentos Controle

Foram realizados 34 experimentos Controle em triplicata, em diferentes dias, para a análise estatística. Em todas as 102 réplicas o crescimento microbiano foi visualizado, sendo desconsiderados, antes da análise estatística, valores que representavam inconsistências físicas:  $X_0$ ,  $\Delta X$  e  $Y_{X/S}$  negativos, e  $Y_{X/S}$  maiores que 1. Com isso, o número total de réplicas (n) do Controle foi 92, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.

Mesmo com todos os cuidados tomados na realização dos experimentos, como utilização de membranas novas e agitação magnética para tomada de alíquotas e análise das amostras, os

resultados apresentaram elevada variabilidade, com coeficientes de variação na faixa de 6 a 46%. Menores variações foram observadas nos valores de carbono solúvel (substrato), indicando que o analisador de carbono pode não ser adequado para a análise de C-org total das amostras com sólidos suspensos deste estudo, mesmo utilizando o kit de sólidos em suspensão. Além disso, a filtração das amostras em membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  pode não ter sido totalmente eficiente na separação das células.

Tabela 5 – Estatística descritiva dos experimentos Controle.

Variável	n <sup>(a)</sup>	Média $\pm$ DP <sup>(b)</sup>	IC95 <sup>(c)</sup>	Erro padrão <sup>(d)</sup>	Valor p Shapiro-Wilk
X <sub>0</sub> (mg C-org/L)	92	108,6 $\pm$ 22,9	103,9 – 113,3	2,4	0,75391
X <sub>4</sub> (mg C-org/L)	92	220,1 $\pm$ 53,0	209,2 – 231,1	5,5	0,11880
$\Delta$ X (mg C-org/L)	92	111,5 $\pm$ 51,4	100,9 – 122,2	5,4	0,08438
S <sub>0</sub> (mg C-org/L)	92	774,8 $\pm$ 48,3	764,8 – 784,8	5,0	0,10364
S <sub>4</sub> (mg C-org/L)	92	567,3 $\pm$ 76,2	551,5 – 583,1	7,9	0,05688
$\Delta$ S (mg C-org/L)	92	207,6 $\pm$ 71,4	192,8 – 222,3	7,4	0,07224
Y <sub>X/S</sub>	92	0,543 $\pm$ 0,174	0,507 – 0,580	0,018	0,01682

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Número de réplicas. <sup>(b)</sup>DP: desvio padrão. <sup>(c)</sup>Intervalo de 95% de confiança. <sup>(d)</sup>Erro padrão da média.

O erro padrão informa sobre a certeza com que a média populacional pode ser representada pela média amostral, não sendo relacionado à variabilidade dos resultados (GLANTZ, 2014). Como o número de amostras é elevado ( $n = 92$ ), os erros padrão das médias apresentaram valores baixos, podendo-se assumir que as médias obtidas são representativas da população. Por isso, os valores médios obtidos no Controle (Tabela 5) foram utilizados como comparação nos experimentos com biossurfactante (Teste), apresentados mais adiante.

Yang, Chen e Yin (2014), tentando padronizar um inóculo em testes de biodegradabilidade aeróbia, também observaram baixa reprodutibilidade nos experimentos realizados com Polyseed. Esses dados comprovam que, apesar de ser considerado um inóculo padrão, a Polyseed apresenta variações que podem influenciar nos resultados do teste em questão.

Para uma análise correta dos dados, é necessário verificar se a distribuição dos resultados é normal, pois isso influencia diretamente na escolha e confiabilidade dos resultados obtidos em testes estatísticos (RAZALI E WAH, 2011). Existem diversos testes para verificar a hipótese de distribuição normal, como Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors, Shapiro-Wilk e Anderson Darling. O teste de Kolmogorov-Smirnov é recomendado quando o tamanho da amostra excede 50 (MANSON, GUNST E HESS, 2003), porém este não deve ser utilizado devido à baixa rejeição de hipótese nula, sendo o teste de Shapiro-Wilk mais indicado na maioria dos casos (GHASEMI E ZAHEDIASL, 2012; RAZALI E WAH, 2011).

Os valores de p apresentados na Tabela 5 para o teste de Shapiro-Wilk demonstram que apenas a distribuição de valores do coeficiente de rendimento celular não pode ser considerada normal ( $p < 0,05$ ). Por este motivo, a comparação dos resultados obtidos nos experimentos Controle e Teste deve ser feita preferencialmente pelos valores de  $\Delta X$  e  $\Delta S$  individualmente.

#### 4.3.3 Efeito de diferentes concentrações de ramnolípídeo sobre o crescimento e consumo de substrato

Para avaliação do efeito do biossurfactante, foi feita uma varredura de concentrações utilizando o mesmo lote de produto (Lote 2, Tabela 2). Devido à elevada variabilidade dos resultados, todos os dados referentes ao Controle (Tabela 5) foram utilizados na comparação com os resultados dos experimentos Teste. A análise estatística foi feita com o teste t (95% de confiança) e os resultados encontram-se na Tabela 6 e Figura 6.

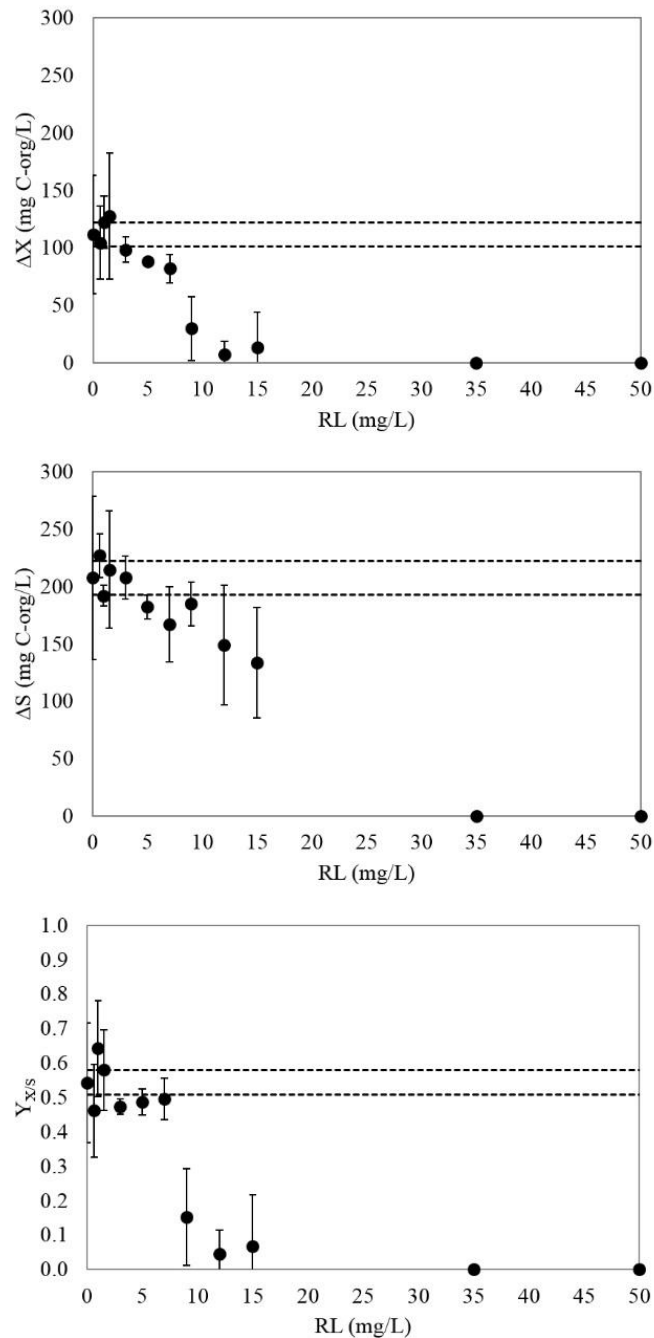
O teste t só pode ser aplicado para comparar as médias de duas amostras se a distribuição for considerada normal, porém é um teste robusto e pode ser utilizado mesmo quando se tem desvios em relação à normalidade (CALLEGARI-JACQUES, 2007; GLANTZ, 2014), sendo por isso utilizado na análise de todas as variáveis, supondo que a distribuição dos experimentos Teste é igual à do Controle.

Tabela 6 – Efeito da concentração de ramnolípídeo sobre a variação de concentrações de biomassa e substrato e do coeficiente de rendimento de um consórcio microbiano padrão.

RL <sup>(a)</sup> (mg/L)	n <sup>(b)</sup>	$\Delta X^{(c)}$ (mg C-org/L)	$\Delta S^{(c)}$ (mg C-org/L)	$Y_{X/S}^{(c)}$
0 – Controle	92	111,5 ± 51,4	207,6 ± 71,4	0,543 ± 0,174
0,65	6	104,5 ± 32,0	226,9 ± 19,0	0,461 ± 0,135
1,0	3	122,5 ± 22,8	192,0 ± 9,1	0,642 ± 0,140
1,5	3	127,6 ± 54,6	214,8 ± 51,5	0,579 ± 0,117
3,0	3	98,4 ± 11,0	208,0 ± 18,6	0,473 ± 0,023
5,0	3	88,4 ± 2,1	182,2 ± 10,4	0,486 ± 0,038
7,0	3	82,1 ± 12,4	167,1 ± 32,5	0,496 ± 0,060
9,0	5	29,6 ± 27,9*	184,8 ± 18,8	0,152 ± 0,141*
12	6	7,2 ± 11,3*	149,1 ± 52,1	0,0450 ± 0,100*
15	5	13,5 ± 30,3*	133,7 ± 48,3*	0,0668 ± 0,149*
35	3	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*
50	3	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Lote 2, Tabela 2. <sup>(b)</sup>Número de réplicas. <sup>(c)</sup>Média ± desvio padrão. \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).

Figura 6 – Efeito da concentração de ramnolipídeos sobre a variação das concentrações de biomassa e substrato e do coeficiente de rendimento de um consórcio microbiano padrão.



Fonte: elaboração própria. Os pontos são referentes à média  $\pm$  desvio padrão. As linhas tracejadas correspondem aos valores do intervalo de confiança (95%) do Controle.

A adição de até 7 mg RL/L não provocou efeito significativo nas respostas analisadas, sendo todos os valores obtidos estatisticamente iguais aos do Controle. Com 9 mg RL/L, observou-se 72% de redução no coeficiente de rendimento celular, sem prejuízo na remoção de substrato. O aumento da concentração para 12 mg RL/L reduziu o valor de  $Y_{x/s}$  em 92%, demonstrando o elevado potencial de aplicação do produto para a redução de lodo. Apesar de 15 mg RL/L também ter reduzido significativamente o crescimento, esta concentração levou à queda no

consumo de substrato, indicando efeito inibitório ou tóxico do biossurfactante. Este efeito se mostrou mais evidente com 35 e 50 mg RL/L, não sendo observados crescimento e tão pouco consumo de substrato nestas concentrações. Para aplicação em sistemas de lodos ativados em escala industrial, deve-se avaliar a concentração a ser adicionada com bastante critério, pois o excesso da substância pode inibir ou causar efeito tóxico às células microbianas, prejudicando o tratamento do efluente, além de implicar em maiores custos de operação.

Araujo *et al.* (2016) avaliaram o potencial de atividade antimicrobiana de ramnolipídeo produzido a partir da mesma cepa de *P. aeruginosa* empregada neste estudo, no teste Tipo I (Quadro 2). Todas as concentrações avaliadas (1 a 5000 mg/L) reduziram o crescimento planctônico das células (culturas puras de *Lysteria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens*), comprovando que o produto apresenta elevado potencial de aplicação como agente antimicrobiano. Com base no estudo de Araujo *et al.* (2016), todas as concentrações avaliadas nesta etapa, com exceção de 0,65 mg RL/L, deveriam ter apresentado redução no crescimento celular. Contudo, o efeito pode ser diferente de acordo com as espécies de microrganismos presentes no sistema avaliado (BALLOT, 2009; BENINCASA *et al.*, 2004; HABA *et al.*, 2003).

No caso de desacopladores metabólicos, apenas a concentração de produto não é suficiente para explicar os resultados obtidos. A relação entre as concentrações de produto e biomassa indicam o real potencial de aplicação do produto (LIU, 2000). Apesar do mecanismo de atuação do biossurfactante ainda ser desconhecido, pressupõe-se que esta relação também influencia os resultados obtidos. Uma comparação entre as concentrações de biomassa empregadas neste estudo e no de Araujo *et al.* (2016) não foi possível, pois foram utilizados diferentes microrganismos e métodos analíticos.

É importante ressaltar que se observa uma tendência de queda na remoção de substrato em concentrações menores que 15 mg RL/L, mesmo que a análise estatística não tenha apontado diferenças significativas. Essa observação não pode ser ignorada para não correr o risco de direcionar os dados obtidos para atender a hipótese formulada, principalmente em um momento em que a integridade de muitos estudos científicos está sendo questionada por apresentar muitos vieses (FANELLI, COSTAS E IOANNIDIS, 2017). Os resultados obtidos, portanto, devem ser usados com cautela, evitando conclusões precipitadas.

#### 4.3.4 Reprodutibilidade de resultados na aplicação de ramnolípídeo em teste rápido

A condução de experimentos em biorreatores de bancada utilizando lodo ativado e efluente industrial é importante para avaliar o real potencial de aplicação do biossurfactante, como será apresentado nos itens 5 e 6 a seguir. Porém, nesses experimentos, diversas variáveis podem influenciar a resposta obtida como, por exemplo, a composição do efluente utilizado. Efluentes de refinaria de petróleo possuem composição extremamente variável, dependendo da refinaria e das unidades em operação no momento da coleta (WAKE, 2005). Apesar de ter sido utilizado efluente oriundo de um mesmo local, diversas coletas foram realizadas ao longo do estudo, tornando praticamente impossível a avaliação do efeito decorrente apenas da adição do produto. Além disso, a adição de (bios)surfactantes aumenta a biodisponibilidade de constituintes típicos de efluentes de refinaria, como por exemplo naftaleno, podendo levar ao acúmulo de intermediários tóxicos, capazes de reduzir o crescimento celular (AUGER, JACOBSON E DOMACH, 1995).

De modo a eliminar a composição do substrato como variável, em paralelo à operação dos biorreatores de bancada que empregaram lodo ativado e efluente industrial (itens 5 e 6), deu-se continuidade aos experimentos de curta duração para confirmação da Hipótese 1, avaliando-se o efeito de diferentes frascos de dois lotes de biossurfactante do tipo ramnolípídeo. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Avaliação de diferentes lotes de biossurfactante do tipo ramnolípídeo em teste rápido.

RL (mg/L)	Lote <sup>(a)</sup>	n <sup>(b)</sup>	$\Delta X^{(c)}$ (mg C-org/L)	$\Delta S^{(c)}$ (mg C-org/L)	$Y_{XS}^{(c)}$
0 – Controle	—	92	111,5 ± 51,4	207,6 ± 71,4	0,543 ± 0,174
5	2 A	3	88,4 ± 2,1	182,2 ± 10,4	0,486 ± 0,038
5	3 B	3	164,8 ± 9,1	292,5 ± 21,4*	0,564 ± 0,021
9	2 A	5	29,6 ± 27,9*	184,8 ± 18,8	0,152 ± 0,141*
9	2 B	3	100,4 ± 10,9	179,1 ± 18,0	0,568 ± 0,117
9	2 C	3	122,1 ± 17,9	219,0 ± 16,3	0,558 ± 0,080
9	3 A	6	51,9 ± 15,4*	72,6 ± 19,7*	0,722 ± 0,154*
9	3 B	3	160,5 ± 19,1	320,3 ± 35,3*	0,501 ± 0,006
12	2 A	6	7,2 ± 11,3*	149,1 ± 52,1	0,0450 ± 0,100*
12	2 B	3	85,4 ± 5,6	170,0 ± 13,6	0,506 ± 0,066
12	3 A	3	16,6 ± 18,2*	53,1 ± 35,6*	0,347 ± 0,325
15	2 A	5	13,5 ± 30,3*	133,7 ± 48,3*	0,0668 ± 0,149*
15	2 B	3	82,3 ± 9,5	138,4 ± 36,0	0,627 ± 0,209
15	3 A	3	26,0 ± 7,2*	0,0 ± 0,0*	0,000 ± 0,000*
15	3 B	3	128,2 ± 47,1	310,5 ± 29,8*	0,417 ± 0,170

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Lotes descritos na Tabela 2. As letras A, B e C correspondem a diferentes frascos. O lote 2A foi utilizado no item 4.3.3 (valores da Tabela 6). <sup>(b)</sup>Número de réplicas. <sup>(c)</sup>Média ± desvio padrão. \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).

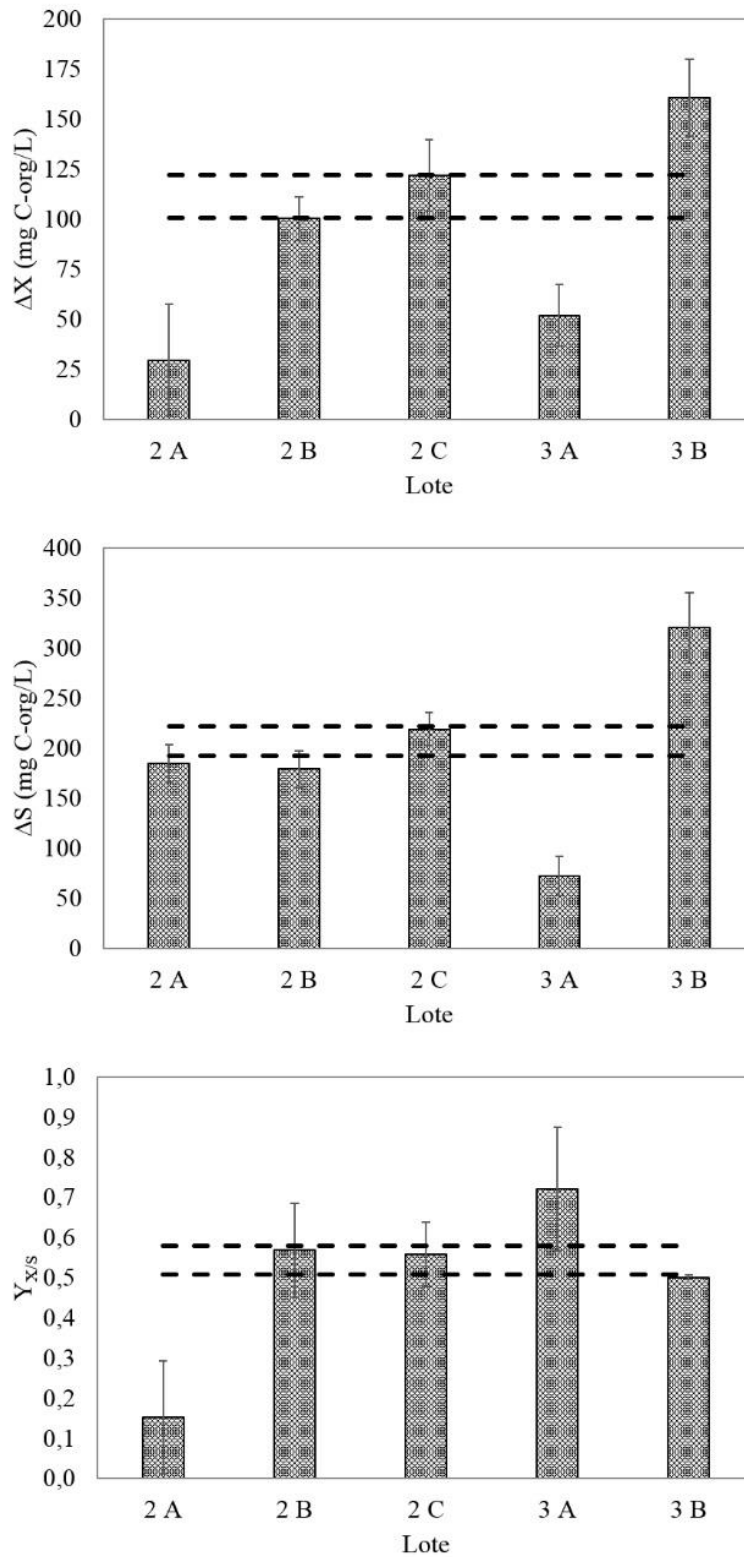


Quando comparados com os valores obtidos anteriormente, não se observa a reprodução dos resultados. Diversas causas podem ter contribuído para a grande variabilidade, tais como: variação nos lotes de biossurfactante, tempo de estocagem do biossurfactante, variação nos lotes e cápsulas de um mesmo lote de Polyseed, pH do meio e metodologia inadequada.

Alterações nas condições de fermentação de *P. aeruginosa* podem resultar em diferentes misturas de ramnolipídeos e respostas (DAS, YANG E MA, 2014; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). Contudo, isto não explica por que frascos de um mesmo lote levaram a resultados diferentes. A Figura 7 apresenta o efeito da adição de 9 mg RL/L oriundos de diferentes lotes e frascos. Avaliando os valores de  $Y_{X/S}$ , apenas o lote 2A, empregado na varredura das concentrações de ramnolipídeo (Tabela 6) foi capaz de reduzir o coeficiente de rendimento celular. Os experimentos com os lotes 2B e 2C foram conduzidos 30 d após os ensaios com o lote 2A. Apesar de a perda de atividade do produto ser possível, seria improvável devido ao curto período de tempo decorrido. Além disso, o lote 3 foi testado pouco tempo após sua produção.

Os experimentos com o lote 2 de biossurfactante (frascos A, B e C) foram realizados partindo-se de um mesmo lote de Polyseed, porém de cápsulas diferentes. Para condução dos experimentos com o lote 3 (frascos A e B), foi utilizado um novo lote de inóculo. Novamente, esta variação é importante, porém dificilmente justifica as diferenças obtidas com frascos de um mesmo lote. Utilizando como exemplo o lote 3, a adição de 9 mg RL/L do frasco A prejudicou o metabolismo microbiano, pois reduziu o crescimento ( $\Delta X$  111,5  $\pm$  51,4 mg C-org/L no Controle e 51,9  $\pm$  15,4 mg C-org/L no Teste) com prejuízo significativo no consumo de substrato ( $\Delta S$  207,6  $\pm$  71,4 mg C-org/L no Controle e 72,6  $\pm$  19,7mg C-org/L no Teste). Em contrapartida, resultado contraditório foi obtido com o frasco B, com células apresentando elevado crescimento ( $\Delta X$  160,5  $\pm$  19,1 mg C-org/L) e consumo de substrato ( $\Delta S$  320,3  $\pm$  35,3 mg C-org/L).

Figura 7 – Avaliação das respostas obtidas com a adição de 9 mg RL/L (diferentes lotes) em experimentos de curta duração.



Fonte: elaboração própria. As linhas tracejadas correspondem aos valores do intervalo de confiança (95%) do Controle. As letras A, B e C após cada número representam diferentes frascos de um mesmo lote. O lote 2A foi utilizado no item 4.3.3.

Um mesmo lote de Polyseed pode apresentar variações significativas entre as cápsulas, conforme observado nos experimentos Controle e na literatura (YANG, CHEN E YIN, 2014). Nos experimentos realizados neste estudo se observou diferenças no crescimento do inóculo após 14 h. Visualmente, alguns apresentavam crescimento muito baixo, então buscou-se uma correlação entre as variáveis avaliadas (absorbância e pH), sendo os resultados apresentados na Tabela 8.

Quando o pH do inóculo diminuía após 14 h (Inóculo Tipo I), o crescimento era reduzido, em comparação àqueles ensaios em que o pH se mantinha aproximadamente constante (Inóculo Tipo II), conforme observado pelos valores de absorbância ( $0,122 \pm 0,011$  e  $0,245 \pm 0,057$ , respectivamente). O mesmo comportamento se reproduzia após 4 h de experimento, com valores de  $\Delta X$  e  $\Delta S$  57% maiores nos Controles referentes ao inóculo Tipo II, mas com valores de  $Y_{X/S}$  mantidos em 0,57 nos dois casos.

Tabela 8 – Avaliação do inóculo (14 h de crescimento) utilizado e respostas no teste rápido.

Condição		Inóculo Tipo I	Inóculo Tipo II
n <sup>(a)</sup>		6 (49)	7 (17)
pH inicial	Inóculo (14 h)	$7,0 \pm 0,1$	$7,0 \pm 0,1$
pH final	Inóculo (14 h)	$6,0 \pm 0,3$	$7,1 \pm 0,2$
Absorbância final	Inóculo (14 h)	$0,122 \pm 0,011$	$0,245 \pm 0,057$
$\Delta X$ (mg C-org/L)	Controle (4 h)	$102,8 \pm 40,5$	$162,3 \pm 53,2$
$\Delta S$ (mg C-org/L)	Controle (4 h)	$182,1 \pm 59,5$	$285,8 \pm 29,4$
$Y_{X/S}$	Controle (4 h)	$0,570 \pm 0,168$	$0,566 \pm 0,180$

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Número de réplicas utilizadas para os valores de pH e absorbância. Entre parênteses, réplicas referentes a  $\Delta X$ ,  $\Delta S$  e  $Y_{X/S}$ .

No caso da adição de 9 mg RL/L (Figura 7), o lote 3A foi testado com inóculo com queda de pH (Tipo I), diferente do lote 3B (Tipo II), o que poderia justificar os resultados divergentes. Pode-se partir de duas hipóteses diferentes para justificar o impacto do pH na variabilidade dos resultados. Uma delas seria o fato de que não é o pH mais baixo que altera o efeito do biossurfactante, mas sim a causa da redução do pH. Ou seja, a variação da composição e número de células viáveis deixaria o inóculo mais ou menos sensível ao efeito do produto. Essa variação pode ter ocorrido por variabilidade nas cápsulas da Polyseed e também em decorrência de falta de luz ao longo das 14 h de crescimento do inóculo, causando deficiência de oxigênio, alterando assim o metabolismo microbiano.

A outra hipótese seria o impacto que o pH do meio causa na estrutura do ramnolipídeo, alterando seu efeito nas células microbianas. A agregação das moléculas de RL é uma das características mais importantes quando se avalia o efeito desses compostos em diversas aplicações, e a formação desses agregados depende da concentração de ramnolipídeo, da

salinidade, da temperatura e do pH do meio (LEBRÓN-PALER *et al.*, 2006; MENDES *et al.*, 2015). Mesmo em faixa restrita de pH, como entre 5 e 7, a formação de agregados pode se alterar (ISHIGAMI *et al.*, 1987). Essa faixa de valores é condizente com os valores de pH observados na Tabela 8, e pode justificar os resultados encontrados.

A adição de biossurfactante purificado ou do caldo bruto livre de células pode resultar em efeitos diferentes, mesmo mantendo-se a mesma concentração de ramnolipídeos, pois com o produto purificado menos compostos interferentes são adicionados ao meio reacional. Os resultados obtidos com o biossurfactante purificado encontram-se na Tabela 9. Neste caso, o perfil do inóculo exerceu papel fundamental no metabolismo microbiano. A adição de 9, 12 e 15 mg RL/L inibiu o crescimento e o consumo de substrato todas as vezes que o inóculo apresentou comportamento do Tipo I. Quando o comportamento era do Tipo II, as células cresceram e consumiram mais substrato que o Controle, mantendo o fator de crescimento em 0,67.

Tabela 9 – Avaliação de biossurfactante do tipo ramnolipídeo purificado em experimentos de curta duração.

RL (mg/L)	Lote <sup>(a)</sup>	n <sup>(b)</sup>	$\Delta X^{(c)}$ (mg C-org/L)	$\Delta S^{(c)}$ (mg C-org/L)	$Y_{X/S}^{(c)}$
0 – Controle	—	92	111,5 ± 51,4	207,6 ± 71,4	0,543 ± 0,174
5	1 A <sup>(d)</sup>	5	65,5±18,2*	112,0±20,0*	0,595±0,185
5	1 B <sup>(e)</sup>	3	194,6±35,0*	326,9±35,5*	0,596±0,097
9	1 A <sup>(d)</sup>	3	0,0±0,0*	0,0±0,0*	0,000±0,000*
9	1 B <sup>(e)</sup>	3	221,5±21,2*	331,6±17,3*	0,667±0,035
9	1 C <sup>(d)</sup>	2	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,000 ± 0,000*
12	1 C <sup>(d)</sup>	2	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,000 ± 0,000*
15	1 A <sup>(d)</sup>	9	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,000 ± 0,000*
15	1 B <sup>(e)</sup>	3	216,4±39,5*	323,3±76,7*	0,675±0,063
15	1 B <sup>(d)</sup>	3	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,000 ± 0,000*
15	1 C <sup>(d)</sup>	12	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,000 ± 0,000*
50	1 A <sup>(d)</sup>	2	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0*	0,000 ± 0,000*

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Lotes descritos na Tabela 2. As letras A, B e C correspondem ao preparo de diferentes soluções do biossurfactante purificado, sendo todas oriundas de um mesmo lote e frasco. <sup>(b)</sup>Número de réplicas. <sup>(c)</sup>Média ± desvio padrão. <sup>(d)</sup>Inóculo do Tipo I. <sup>(e)</sup>Inóculo do Tipo II. \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).

No caso da adição de 5 mg RL/L, independente do tipo de inóculo, o valor de  $Y_{X/S}$  se manteve em 0,60, apesar de crescimento e consumo de substrato terem sido menos pronunciados com o inóculo Tipo I. Quando se compara o efeito da adição de 9 mg RL/L com os lotes 1B (purificado, Tabela 9) e 3B (bruto, Tabela 7), ambos com inóculo Tipo II, observa-se que o produto purificado resulta em maior coeficiente de rendimento (0,667 ± 0,035 e 0,501 ± 0,006, respectivamente). Em contrapartida, quando o inóculo é do Tipo I, o efeito negativo é mais pronunciado com o biossurfactante purificado, uma vez que não foram observados consumo de

substrato e crescimento microbiano. Desta forma, pode-se supor que o efeito (desejado ou não) do produto purificado é mais pronunciado, sendo altamente dependente do tipo de microrganismo avaliado.

#### **4.4 Conclusões**

Os resultados mostram que o biossurfactante foi capaz de alterar o metabolismo microbiano conforme esperado. Ou seja, levou à redução do crescimento sem prejuízo significativo da remoção de matéria orgânica, de acordo com a análise estatística (teste t,  $\alpha$  0,05). A adição de 9 mg RL/L seria a concentração mínima necessária para observação do efeito nas condições do teste e 12 mg RL/L, a concentração de maior efeito. A adição de concentrações maiores ou iguais a 15 mg RL/L prejudicou a remoção de substrato, efeito contrário ao desejado.

No entanto, o teste utilizado apresenta variação muito elevada dos resultados obtidos, não sendo necessariamente a melhor opção para avaliação do potencial de aplicação de um produto para redução de lodo. Além disso, como o efeito do biossurfactante deve ser altamente dependente do tipo de inóculo empregado, os resultados comprovaram a não adequação da Polyseed como inóculo nesta metodologia, uma vez que não se obtém resultados padronizados.

O efeito (positivo ou negativo) do biossurfactante purificado é mais pronunciado do que o efeito do biossurfactante bruto, indicando que uma etapa de purificação pode reduzir a concentração mínima necessária para obtenção do efeito desejado.



## 5 Efeito de biossurfactante do tipo ramnolipídeo em sistemas de lodos ativados

### 5.1 Introdução

A adição de desacopladores metabólicos visando à redução do lodo de excesso em sistemas de lodos ativados é estudada desde a década de 90 e diversos fatores que influenciam o processo já foram identificados, tais como características e concentração do produto, e a relação entre as concentrações de produto e biomassa do sistema (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010; LIU, 2000). O mesmo pode ser extrapolado para qualquer produto utilizado com o objetivo de minimizar a produção de lodo, como no caso dos biossurfactantes.

As condições de teste de um produto visando à redução de lodo podem influenciar seu resultado, não sendo este necessariamente reproduzido em um sistema de tratamento de efluentes em escala industrial. O tempo de contato entre a biomassa e o produto deve apresentar elevada influência na resposta obtida, uma vez que as células são capazes de se adaptar às condições impostas (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010; GUO *et al.*, 2013), levando à perda de efeito do produto.

No caso dos testes de curta duração (item 4) que mostraram a capacidade de redução do coeficiente de rendimento celular em concentrações entre 9 e 12 mg RL/L, o tempo de contato entre biomassa e produto foi de apenas 4 h. Somado a isso, as condições iniciais desses testes são bem diferentes das condições adotadas em sistemas de lodos ativados. De acordo com a Tabela 5, tem-se as seguintes concentrações iniciais de biomassa e substrato:  $X_0$  108,6 mg C-org/L e  $S_0$  774,8 mg C-org/L. Considerando que metade do peso seco de bactérias é carbono (TORTORA, FUNKE E CASE, 2010),  $X_0$  nos testes foi de aproximadamente 217 mg SST/L. Lodos ativados convencionais operam, normalmente, com 1500 a 4000 mg SST/L (METCALF & EDDY, 2016), indicando elevada diferença entre as concentrações iniciais de biomassa nos testes e em sistemas de tratamento em escala industrial. Além da concentração de biomassa, a diversidade de espécies nos testes (Polyseed) e nos sistemas de tratamento é muito diferente (VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2011), o que também pode influenciar os resultados.

A caracterização de um dos lotes do meio TSB forneceu resultados de C-org e DQO iguais a 320 e 754 mg/g, respectivamente, podendo-se considerar  $S_0$  1826 mg/L (DQO). O processo de lodos ativados é utilizado para tratar efluentes com as mais variadas características (PAUL E LIU, 2012), sendo a matéria orgânica introduzida avaliada com base na relação F/M

(alimento/biomassa) e na COV (carga orgânica volumétrica), e não na DQO da alimentação. Nos experimentos realizados anteriormente (item 4), os valores de F/M e COV podem ser estimados em, respectivamente, 25 kg DBO/kg SST.d e 5,5 kg DBO/m<sup>3</sup>.d (considerando uma relação DQO/DBO para o meio TSB de 2). O cálculo é aproximado, pois esses parâmetros são inerentes a um processo em regime contínuo, mas servem como indicativo de ordem de grandeza. Lodos ativados operam com F/M 0,04 a 0,6 kg DBO/kg SSV.d e COV 0,1 a 1,6 kg DBO/m<sup>3</sup>.d (METCALF & EDDY, 2016), valores bem inferiores aos utilizados nos experimentos anteriores.

As diferenças apontadas confirmam que o teste anteriormente utilizado não é representativo do efeito que o produto pode apresentar em um sistema de tratamento de efluentes por lodos ativados em escala industrial. Por isso, o objetivo desta etapa do estudo foi avaliar o efeito da adição de biossurfactante do tipo ramnolípídeo em um sistema de lodos ativados de bancada operando em condições mais próximas às adotadas em um sistema de tratamento em escala industrial.

## 5.2 Procedimento experimental

A operação dos biorreatores em bateladas sequenciais, denominada Operação 1, se deu conforme metodologia descrita anteriormente (ALEXANDRE, 2013), simulando condições de operação de uma unidade de lodos ativados em operação em refinaria de petróleo: TRH<sup>4</sup> 5,5 h, razão de reciclo 1 e TRS 20 d. Lodo centrifugado proveniente de um sistema de lodos ativados de refinaria de petróleo foi utilizado como inóculo para a partida dos biorreatores com 2800 mg SSV/L. A alimentação dos biorreatores (Tabela 10) era composta por efluentes de refinaria de petróleo (denominados água ácida e água oleosa) e efluente sintético, de modo que a mistura apresentasse DQO em torno de 1000 mg/L. O efluente sintético apresenta compostos tipicamente encontrados em efluentes de refinaria e teve sua composição adaptada a partir do estudo de Brookes (2005), conforme Tabela 11.

A alimentação era acrescida de fósforo para manter uma relação DQO:P de 100:1, própria para o metabolismo aeróbio, e ferro e alumínio eram adicionados para auxiliar na floculação do lodo, conforme recomendação de Novak *et al.* (2007).

---

<sup>4</sup> TRH: Tempo de retenção hidráulica.



Considerando apenas os sais adicionados na alimentação, as concentrações de P, Fe e Al eram, respectivamente, 12, 7 e 1,6 mg/L. Entretanto, fosfato é capaz de precipitar com sais de  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  (METCALF & EDDY, 2016). Logo, existe a possibilidade de parte do fósforo ter ficado indisponível para os microrganismos.

Tabela 10 – Composição da alimentação dos biorreatores de bancada.

Efluente / Solução	Composição / Origem	Volume	DQO (mg/L)
Água ácida	Refinaria	1 L	1463 ± 687
Água oleosa	Refinaria	1,88 L	331 ± 144
Efluente sintético		60 mL	24860 ± 1407
Tabela 11			
Fósforo	40,42 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6,58 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4$	3 mL	—
Ferro	6,66 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	15 mL	—
Alumínio	4,0 g/L $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$	15 mL	—
Total	—	3 L	1000 <sup>(a)</sup>

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Valor estimado com base nos valores de DQO de cada efluente na mistura.

Tabela 11 – Composição do efluente sintético utilizado no preparo da alimentação dos biorreatores.

Composto	Concentração (mg/L)	Composto	Concentração (mg/L)
Tolueno	190	Ácido butírico	20
Etilbenzeno	40	Etanol	13000
Xileno	100	Etilenoglicol	1580
Naftaleno	17	NaCl	9887
Fenol	250	Ureia	2140
Ácido acético	280	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2960
Ácido propiônico	70	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	480

Fonte: adaptado de Brookes (2005).

Foram utilizados como biorreatores béqueres de vidro de 1 L com 50% de volume útil, operados à temperatura ambiente (19-28°C), com agitação magnética e aeração realizada por introdução de ar através de difusor poroso localizado ao fundo dos biorreatores. Durante a operação considerou-se 260 mL de volume de sobrenadante e 240 mL de lodo. Com exceção dos finais de semana, todos os dias pela manhã metade do sobrenadante (130 mL) era substituída por nova alimentação (130 mL), de modo a simular uma razão de reciclo de 1. Após 5,5 h, retirava-se 25 mL de licor misto para análise (pH, DQO solúvel, sólidos suspensos, volume sedimentado) e manutenção do TRS em 20 d (considerando SST do sobrenadante desprezível). Após 30 min de sedimentação, todo o sobrenadante do biorreator (235 mL) era substituído por nova alimentação (260 mL), de modo a garantir a manutenção das células até o dia seguinte. Nesta substituição, o sobrenadante removido do biorreator era descartado, sem análise.

Dois biorreatores operaram em paralelo: um Teste, com adição de biossurfactante do tipo ramnolípido, e um Controle, sem adição de produto. Inicialmente, o produto avaliado foi

adicionado na alimentação, de modo que esta apresentasse a concentração desejada. Em seguida, o produto passou a ser adicionado diretamente no reator, pois esta forma de operação se mostrou mais adequada em estudos anteriores (ALEXANDRE, 2013). Três lotes de produto foram utilizados (lotes 3, 4 e 5, Tabela 2), sendo conduzida uma varredura de concentrações para determinar o valor mínimo necessário para redução do descarte de lodo.

Os métodos analíticos estão descritos no Apêndice A.

### **5.3 Resultados e discussão**

Ambos os biorreatores operaram sem adição de produto por 15 dias, a fim de adaptar o lodo aos constituintes da alimentação e às condições de operação. Este período não foi suficiente para estabilizar a concentração de sólidos suspensos, que ainda se encontrava em queda. No entanto, a eficiência de redução de DQO estabilizou, mantendo uma média de  $91,0 \pm 0,9\%$  em ambos os reatores já na segunda metade deste período.

Após adaptação, teve início a adição de biossurfactante do tipo ramnolípídeo no biorreator Teste. Os 249 dias de operação foram divididos em 8 períodos com base na concentração, na forma de adição e no lote do produto. Os resultados encontram-se na Tabela 12 e Figura 8. Os dados do biorreator Teste foram comparados com os do Controle através do teste t ( $\alpha 0,05$ ) em cada período avaliado. Alguns parâmetros apresentaram pequenos desvios da normalidade, mas como as amostras foram iguais em tamanho, o teste pode ser considerado confiável (CALLEGARI-JACQUES, 2007).

Tabela 12 – Efeito da concentração de biossurfactante do tipo ramnolípido em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com mistura de efluentes de refinaria de petróleo e sintético.

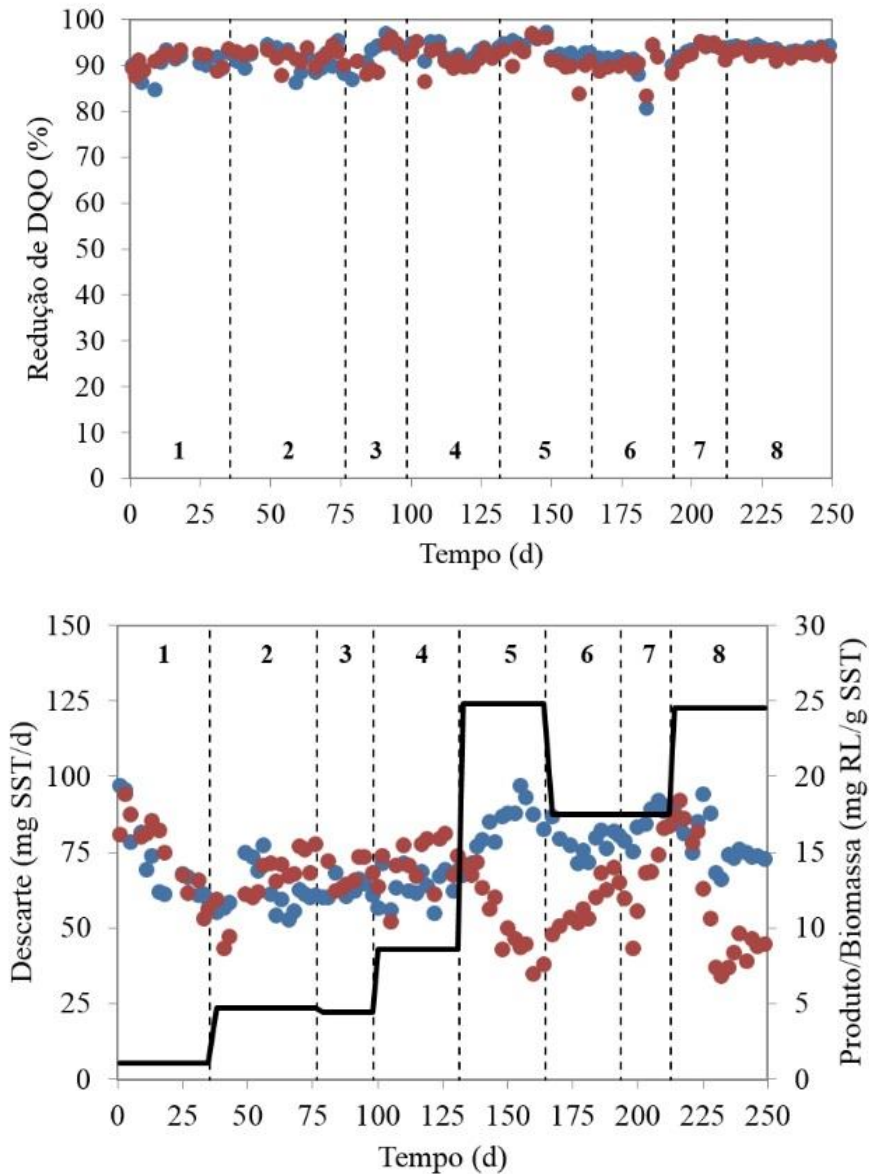
Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 35) <sup>(a)</sup>	Período 2 (36 a 76)	Período 3 (77 a 98)	Período 4 (99 a 131)	Período 5 (132 a 164)	Período 6 (165 a 193)	Período 7 (194 a 212)	Período 8 (213 a 249)
Tempo (d)		35	41	22	33	33	29	19	37
n <sup>(b)</sup>		12 a 15	16	8 a 9	12 a 14	13 a 14	10 a 11	7 a 8	16
[Produto] no reator (mg RL/L)	Teste	3,1 <sup>(c)</sup>	12	12	24	50	40	45	50
Lote de produto (Tabela 2)	Teste	3	4	5	5	5	5	5	4
DQO alimentação (mg/L)	Controle	1055±49	1051±137	916±83	1019±152	1152±55	1132±318	1120±96	1236±78
	Teste								
DQO saída <sup>(d)</sup> (mg/L)	Controle	107±24	92±25	64±28	73±21	94±22	151±154	69±8	79±8
	Teste	96±19	84±14	77±33	86±24	96±42	146±112	77±16	91±10*
Redução de DQO (%)	Controle	89,9±2,4	91,1±2,6	93,0±3,1	92,9±1,7	93,8±2,0	90,3±3,8	93,8±1,1	93,6±0,7
	Teste	90,8±1,9	91,9±1,7	91,8±3,1	91,5±2,2	91,8±3,4	89,6±2,8	93,0±1,7	92,7±0,7*
pH alimentação	Controle	7,0±0,1	7,1±0,1	7,1±0,2	7,1±0,1	7,2±0,1	7,4±0,2	7,5±0,1	7,5±0,1
	Teste								
pH saída <sup>(d)</sup>	Controle	7,5±0,3	7,2±0,5	6,7±0,6	6,5±0,5	6,9±0,3	6,2±0,8	7,5±0,2	7,9±0,7
	Teste	7,8±0,2*	7,5±0,2*	7,0±0,4	7,0±0,6	7,2±0,6	7,2±0,4*	7,4±0,4	8,0±0,6
SST (mg/L)	Controle	2874±513	2480±306	2510±116	2565±223	3327±332	3138±185	3411±237	3118±314
	Teste	2983±508	2611±390	2711±189*	2844±330*	2124±506*	2322±301*	2680±551*	2283±830*
SSV (mg/L)	Controle	2047±261	2066±280	2102±130	2166±190	2828±318	2679±205	2882±187	2574±348
	Teste	2135±270	2182±330	2284±160*	2469±287*	1800±451*	1989±312*	2370±490*	1953±769*
SSV/SST	Controle	0,72±0,05	0,83±0,06	0,84±0,02	0,85±0,03	0,85±0,04	0,85±0,03	0,85±0,03	0,83±0,07
	Teste	0,72±0,07	0,84±0,04	0,84±0,03	0,87±0,03	0,85±0,04	0,85±0,04	0,89±0,05	0,85±0,09
IVL <sup>(e)</sup> (mL/g)	Controle	63±14	89±10	101±7	202±59	173±91	112±24	162±21	233±51
	Teste	54±7	95±10	103±6	100±14*	98±24*	57±9*	68±7*	70±12*

Tabela 12 – Efeito da concentração de biossurfactante do tipo ramnolípido em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com mistura de efluentes de refinaria de petróleo e sintético (cont).

Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 35) <sup>(a)</sup>	Período 2 (36 a 76)	Período 3 (77 a 98)	Período 4 (99 a 131)	Período 5 (132 a 164)	Período 6 (165 a 193)	Período 7 (194 a 212)	Período 8 (213 a 249)
Produto/Biomassa (mg RL/g SST)	Teste	1,1±0,20 <sup>(c)</sup>	4,7±0,85	4,4±0,31	8,6±1,1	25±6,0	17±2,2	18±4,1	25±7,9
Descarte de lodo (mg SST/d)	Controle	72±13	62±8	63±3	64±6	83±8	78±5	85±6	78±8
	Teste	75±13	65±10	68±5*	71±8*	53±13*	58±8*	67±14*	57±21*
Redução no descarte (%)	Teste	-3,8	-5,3	-8,0*	-11*	36*	26*	21*	27*

Fonte: elaboração própria. Operação: TRH 5,5 h, razão de reciclo 1, TRS 20 d. <sup>(a)</sup>Tempo de operação no período, em dias. <sup>(b)</sup>Número de análises do período. <sup>(c)</sup>O produto foi adicionado na alimentação, de modo que esta apresentasse 12 mg RL/L; levando em consideração a diluição (130 mL/500 mL), o reator apresentava a concentração indicada. <sup>(d)</sup>Amostra de licor misto centrifugada (2069 g, 10 min). <sup>(e)</sup>IVL: índice volumétrico de lodo. \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).

Figura 8 – Efeito da concentração de ramnolipídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com mistura de efluentes de refinaria de petróleo e sintético.



Fonte: elaboração própria. Pontos azuis (•) representam dados do biorreator Controle e pontos vermelhos (•) dados do biorreator Teste. A linha cheia (—) representa os valores médios da relação produto/biomassa de cada período. Linhas tracejadas (---) na vertical separam diferentes períodos de operação, baseados em mg RL/L e lotes de biossurfactante. Período 1: 3,1 mg RL/L (lote 3). Período 2: 12 mg RL/L (lote 3). Período 3: 12 mg RL/L (lote 4). Período 4: 24 mg RL/L (lote 5). Período 5: 50 mg RL/L (lote 5). Período 6: 40 mg RL/L (lote 5). Período 7: 45 mg RL/L (lote 5). Período 8: 50 mg RL/L (lote 4).

Em termos de redução de DQO, só foi observada diferença estatisticamente significativa nos resultados do último período de operação, porém a diferença de eficiência entre o Teste e o Controle foi muito pequena ( $93,6 \pm 0,7$  % no Controle e  $92,7 \pm 0,7$  % no Teste). Além disso, o cálculo da eficiência foi feito sem levar em consideração a DQO proveniente do próprio produto (Equação (14)), não devendo a diferença de eficiência ser representativa.

Calculando a eficiência através do balanço de massa (Equação (15)), utilizando os valores médios do Período 8 e a DQO do biossurfactante (25255 mg/L), é possível estimar uma redução de DQO de 88% para o Controle e 90% para o Teste, concluindo-se que o produto não afetou a eficiência de remoção de matéria orgânica do tratamento, mesmo quando se considera sua contribuição na DQO introduzida no biorreator Teste.

No biorreator Teste, a adição direta de 12 (Período 3) e 24 mg RL/L (Período 4) induziu o crescimento da biomassa, fazendo com que o descarte de lodo fosse até 11% maior que no Controle. Apesar de pequena, esta diferença mostra uma tendência de que quanto maior a concentração de biossurfactante, maior o descarte de lodo. Em escala industrial, um aumento de 10% no descarte de lodo pode representar um aumento bastante significativo no custo de operação da planta (GINESTET, 2007), por isso a avaliação da concentração de produto a ser aplicada deve ser bem criteriosa.

Efluentes de refinaria de petróleo contêm compostos hidrofóbicos que podem ter sua absorção e taxa de consumo aumentadas na presença de surfactantes (UYSAL E TÜRKMAN, 2005). Sponza e Gök (2010) observaram que a adição de 15 mg RL/L em lodos ativados tratando efluente de refinaria aumentou em 18% a remoção de hidrocarbonetos poliaromáticos, sendo mais de 90% desta remoção decorrente de processos biológicos. Uysal e Türkman (2005), por sua vez, aumentaram a remoção de 2,4-diclorofenol pela adição de biossurfactante comercial do tipo ramnolípido no sistema de lodos ativados, porém com aumento da concentração de sólidos no reator. Esses dados mostram que nos Períodos 3 e 4 a adição do biossurfactante pode ter aumentado a absorção de diversos componentes presentes no meio, induzindo o crescimento celular e, conseqüentemente, aumentando o descarte de lodo. Além disso, estas concentrações podem não ter sido suficientes para induzir o efeito desejado no sistema, fazendo com que o produto servisse apenas como substrato adicional para as células e levando, naturalmente, a um maior crescimento da biomassa.

O efeito esperado de redução de lodo foi observado apenas no 5º período de operação, correspondente à adição de 50 mg RL/L diretamente no biorreator Teste nas duas trocas diárias

de meio, levando a 36% de redução no descarte ( $83 \pm 8$  e  $53 \pm 13$  mg SST/d no Controle e Teste, respectivamente). Na Figura 8 é possível observar que a redução no descarte não ocorreu logo no início do período. Durante os primeiros 7 dias deste período, a concentração de sólidos no biorreator Teste permaneceu praticamente constante ( $2803 \pm 94$  mg SST/L), indicando que o efeito do produto não foi imediato. Considerando apenas os dias 146 a 164, quando o efeito foi mais evidente, a redução no descarte foi de 52%, resultado bastante expressivo, principalmente porque não foi observado prejuízo na redução de DQO no mesmo período.

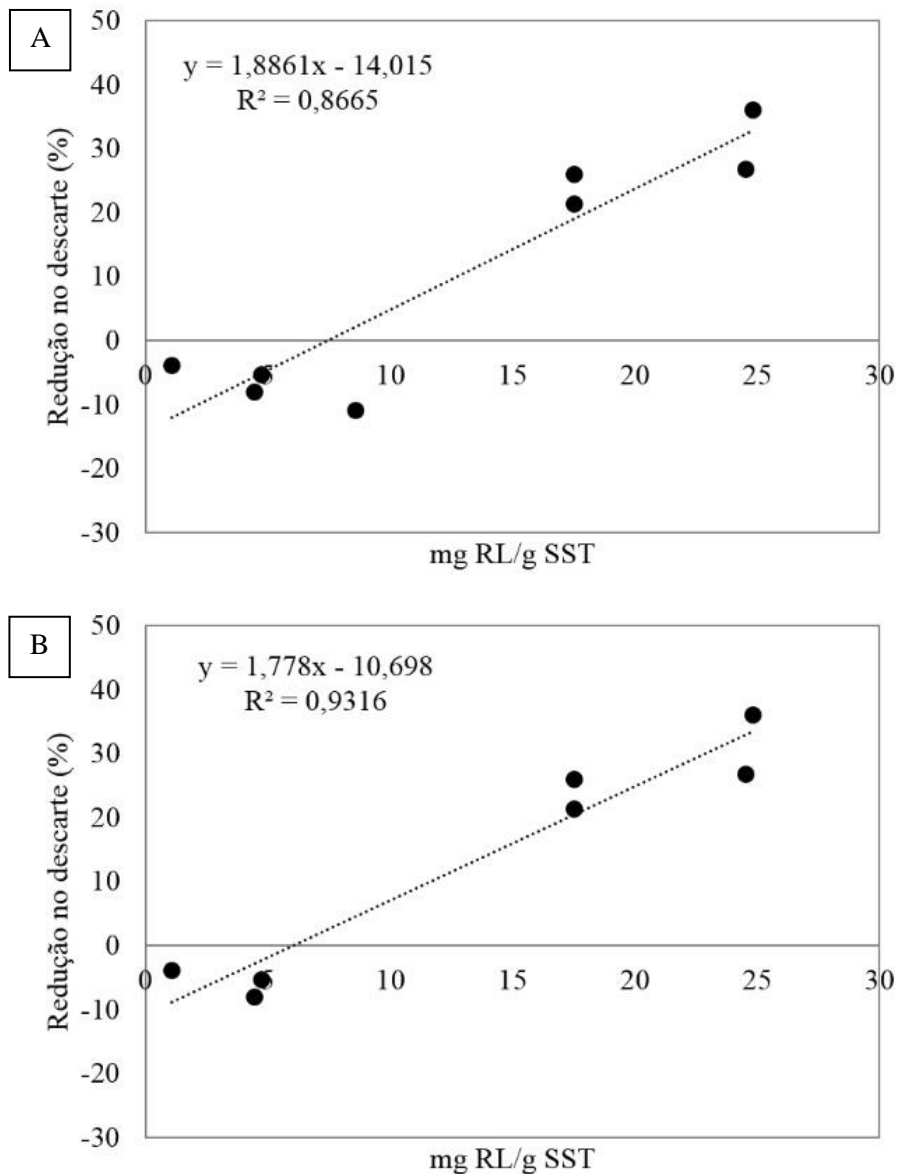
Os Períodos 6 e 7 operaram com adição de 40 e 45 mg RL/L, respectivamente, de modo a verificar a concentração mínima necessária para redução do descarte de lodo, visando à redução dos custos de aplicação. As médias de ambos os períodos indicaram redução no descarte de lodo de até 26%. Entretanto, a Figura 8 mostra um descarte crescente no biorreator Teste em ambos os períodos, indicando perda do efeito do produto, apesar de as médias ainda serem estatisticamente diferentes. Ao se adicionar novamente 50 mg RL/L (Período 8), obteve-se redução média de 27% no descarte e, ao se descartar os valores iniciais, obtém-se redução máxima de 41% (dias 225 a 249). Isso mostra que 50 mg RL/L seria a concentração mínima necessária, nas condições experimentais empregadas, para se conseguir uma redução de lodo na faixa de 41 a 52%.

Ambos os períodos com adição de 50 mg RL/L (Períodos 5 e 8) apresentaram valores estatisticamente iguais da relação produto/biomassa, com média de 25 mg RL/g SST. Ao longo da operação não foi possível avaliar o efeito desta relação, pois o aumento da concentração de produto estava necessariamente atrelado ao aumento da relação. A correlação com a redução no descarte mostrou que quanto maior a relação produto/biomassa, maior a redução de lodo ( $R^2$  0,8665 a 0,9316, Figura 9). Esse resultado leva a crer que o efeito do biossurfactante também é dependente deste parâmetro, assim como nos desacopladores metabólicos (LIU, 2000).

Ao longo da operação, a sedimentação do lodo foi muito prejudicada em decorrência do efluente sintético na alimentação, que contribuía com 50% da matéria orgânica adicionada. A metodologia utilizada para determinação do volume de lodo sedimentado foi adaptada, usando volume muito reduzido de amostra. Dessa forma, o valor de IVL obtido pode não representar o real valor deste parâmetro, servindo apenas para comparar a sedimentação nos biorreatores Controle e Teste. A partir do Período 4, o lodo do biorreator Teste apresentou valores de IVL significativamente menores que no Controle (50%, 43%, 49%, 58% e 70% nos Períodos 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente). A sedimentação do lodo pode ser avaliada pelos valores de IVL, mas também pela qualidade do sobrenadante gerado. Apesar de não ter sido feita a caracterização

do sobrenadante em termos de sólidos suspensos, visualmente não se observou aumento de turbidez no sobrenadante do biorreator Teste, indicando melhores propriedades de sedimentação do lodo com a adição de RL.

Figura 9 – Correlações observadas no biorreator Teste.



Fonte: elaboração própria. Cada ponto corresponde à média de um período de operação e a linha pontilhada corresponde à linha de tendência. (A) Correlação utilizando os resultados de todos os períodos. (B) Correlação descartando o valor referente ao Período 4.

Vale ressaltar que nesta etapa do estudo a adição do biossurfactante a partir da concentração de 24 mg/L levou a uma intensa formação de espuma branca que, ao ser removida do sistema, poderia levar a uma perda de sólidos suspensos. No entanto, a quantificação de sólidos suspensos nesta espuma não foi realizada. Se a remoção de sólidos do sistema pela espuma fosse significativa, não teria sido possível observar a perda do efeito do produto nos Períodos 6 e 7 (40 e 45 mg RL/L, respectivamente), quando também havia formação intensa de espuma.



Além disso, se a redução de lodo fosse decorrente apenas da perda de sólidos pela espuma, provavelmente não se teria observado valores de IVL mais baixos no biorreator Teste. Logo, os resultados obtidos podem ser considerados confiáveis.

No teste rápido (Tabela 6), a adição de 7 mg RL/L ( $\approx$  32 mg RL/g SST) não reduziu o crescimento microbiano, já que o valor de  $Y_{X/S}$  foi estatisticamente igual ao do Controle. A adição de 9 e 12 mg RL/L ( $\approx$  41 e 55 mg RL/g SST) levou a 72 e 92% de redução no crescimento, respectivamente. Ou seja, enquanto no teste rápido a redução de crescimento só foi observada com pelo menos 41 mg RL/g SST, em sistemas de lodos ativados, 25 mg RL/g SST foi o mínimo necessário para se conseguir redução no descarte de lodo. Isso mostra que a concentração e a relação produto/biomassa não são suficientes para explicar todos os resultados obtidos, e outros fatores exercem influência na resposta obtida, como, por exemplo, o tempo de contato da biomassa com o produto em questão.

#### **5.4 Conclusões**

O biossurfactante do tipo ramnolipídeo avaliado pode induzir ou reduzir o descarte de lodo em sistemas de lodos ativados, dependendo da concentração e condições de operação adotadas. Nas condições testadas, a adição de 12 e 24 mg RL/L aumentou o descarte de lodo em até 11%. No entanto, com 50 mg RL/L ou 25 mg RL/g SST obteve-se reduções de lodo na faixa de 41 a 52%, sem prejuízo da redução de DQO e com menores valores de IVL do lodo (com, no mínimo, 24 mg RL/L).

Uma forte correlação entre redução do descarte de lodo e a relação produto/biomassa leva a crer que o efeito do biossurfactante pode ser dependente deste parâmetro, assim como os desacopladores metabólicos. Porém, outros fatores além de concentração de produto e relação produto/biomassa podem exercer influência nas respostas obtidas, como o tempo de contato da biomassa com o biossurfactante.



## **6 Variabilidade de resultados obtidos com adição de ramnolipídeo em sistemas de lodos ativados em bateladas sequenciais**

### **6.1 Introdução**

Visando qualquer modificação de processo em escala industrial, é importante garantir a reprodutibilidade dos resultados, entendendo todos os fenômenos envolvidos (GINESTET, 2007). Na adição de biossurfactantes nos sistemas de lodos ativados, diversos fatores têm efeito sobre os resultados obtidos, pois trata-se de um processo biológico dinâmico, no qual a população microbiana se encontra sob constante mudança devido à variabilidade de composição dos efluentes e das condições de operação (DEZOTTI, SANT'ANNA JR. E BASSIN, 2011; PAUL E LIU, 2012; PUIGAGUT *et al.*, 2007; PUIGAGUT, SALVADÓ E GARCÍA, 2005). Além disso, o próprio produto utilizado como aditivo no processo é produzido por microrganismos, estando também sujeito a variações (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

Os desacopladores metabólicos são estudados há muitos anos e sua efetividade para reduzir a produção de lodo de excesso já foi comprovada em diversos estudos e em algumas aplicações em sistemas industriais (SAINI, 2014), porém a maior parte dos estudos publicados apresenta conclusões específicas para o sistema avaliado. Quando se comparam os resultados desses estudos com diferentes efluentes e condições de operação, estes se mostram bastante variáveis. A Tabela 13 mostra resultados obtidos com a adição de dnP em diferentes estudos, observando-se reduções de lodo variando de 56% a -50%.

No estudo de Alexandre (2013), a adição de 2,6 mg dnP/L reduziu o descarte em 15 a 30%, com resultados não inteiramente justificados pela relação produto/biomassa, uma vez que obteve-se 30% de redução do descarte com 2,3 e 4,7 mg dnP/g SSV. Comparando este mesmo estudo com o de Chen et al. (2008), 19% de redução de lodo foi obtida com a mesma concentração de produto (2,5-2,6 mg dnP/L) e diferentes relações produto biomassa (0,37 e 1,4 mg dnP/g SST), apenas com diferenças no TRS (20 e 15 d, respectivamente). A adição de 20 mg dnP/L, mantendo relações produto/biomassa próximas (13 mg dnP/g SST e 8,9 mg dnP/g SSV) reduziu em 56% e aumentou em 11% o coeficiente de rendimento celular (ARAGÓN, QUIROGA E COELLO, 2009; CHEN, YU E XI, 2006), ambos em experimentos de batelada única e efluente sintético (Tabela 13).

Tabela 13 – Levantamento bibliográfico sobre adição de 2,4-dinitrofenol em lodos ativados.

mg dnP/L <sup>(a)</sup>	Efluente	Operação	Resultado	Referência
2,5	Sintético (amido)	Bateladas sequenciais TRH 4,5 h TRS 10 a 30 d	Redução na taxa de produção de lodo:	Chen et al. (2008)
			30% (TRS 10 d)	
			19% (TRS 15 d)	
			10% (TRS 20 d)	
			18% (TRS 25 d)	
20% (TRS 30 d)				
			(0,37 a 0,48 mg dnP/g SST)	
2,6	Refinaria	Bateladas sequenciais TRH 5,5 h TRS 20 d	Redução no descarte de lodo:	Alexandre (2013)
			15% (2,0 mg dnP/g SSV)	
			19% (1,5 mg dnP/g SSV)	
			30% (2,3-4,7 mg dnP/g SSV)	
4	Esgoto	Contínuo TRH 5,5 h TRS 1,5 d	29% de redução no $Y_{X/S}$ (1,6 mg dnP/g SST)	Mayhew; Stephenson (1998)
5 10 20	Sintético (sacarose)	Batelada única de 3 h	Redução no $Y_{X/S}$ :	Chen; Yu; Xi (2006)
			19% (3,1 mg dnP/g SST)	
			44% (6,3 mg dnP/g SST) <sup>(b)</sup>	
			56% (13 mg dnP/g SST) <sup>(b)</sup>	
20 30 40	Sintético (peptona, extrato de carne)	Batelada única de 6 h	Redução no $Y_{X/S}$ :	Aragón; Quiroga; Coello (2009)
			-11% (8,9 mg dnP/g SSV)	
			14% (13 mg dnP/g SSV)	
			-50% (18 mg dnP/g SSV)	

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Concentração no reator. <sup>(b)</sup>Prejuízo na redução de DQO.

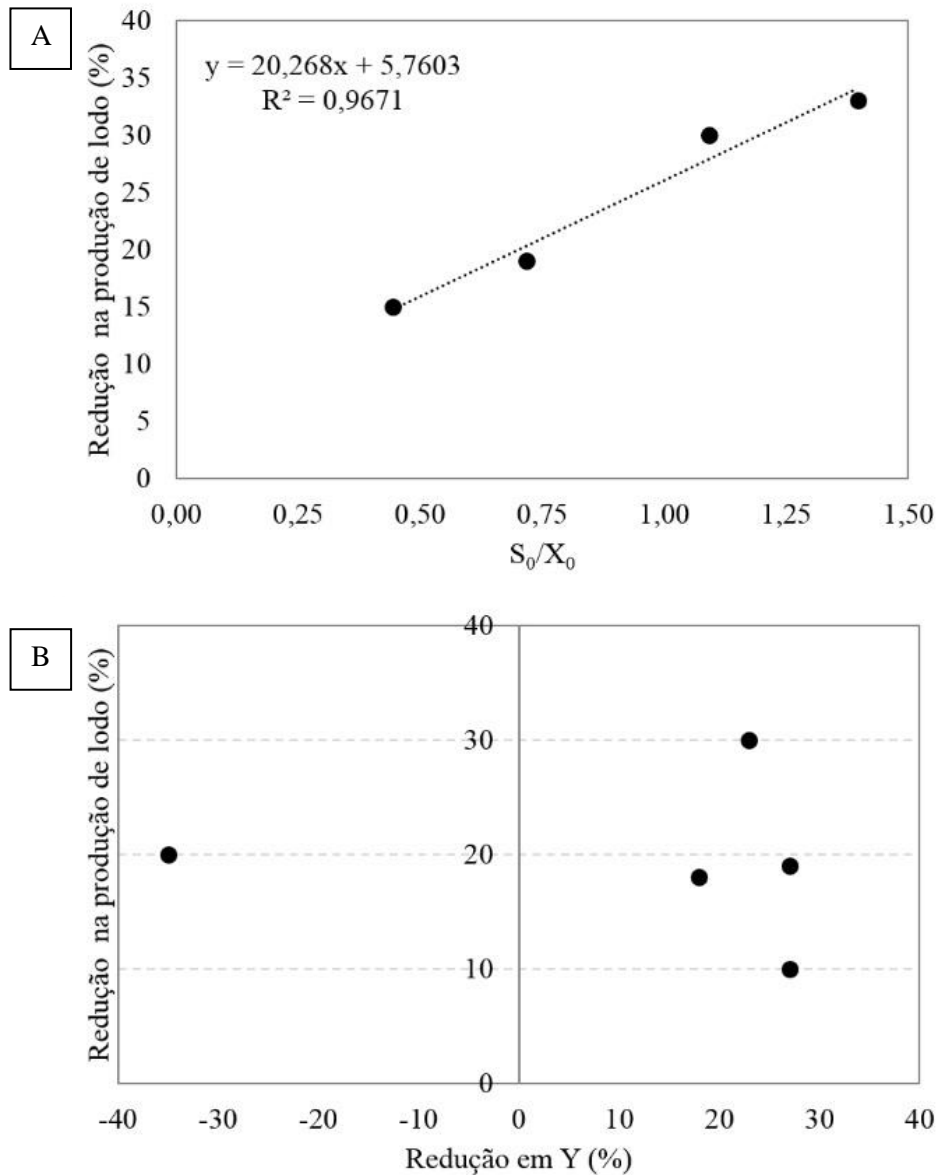
Grande parte das variações obtidas nestes estudos é explicada por diferenças na relação  $S_0/X_0$ , pois o aumento desta relação favorece o desacoplamento metabólico, reduzindo a produção de biomassa (LIU, 1996). A Figura 10A, por exemplo, mostra que esta variável tem 97% de correlação com a redução de lodo obtida.

Normalmente, se expressa a redução de lodo em função do coeficiente de rendimento celular ( $Y_{X/S}$ ) e da taxa de produção de biomassa (mg SST/d). No entanto, no estudo de Chen *et al.* (2008) não se observou correlação entre estas duas variáveis, conforme apresentado na Figura 10B, ou seja, pode-se reduzir  $Y_{X/S}$  sem necessariamente reduzir o descarte de lodo. O principal objetivo dos estudos de redução de lodo é reduzir a massa de lodo encaminhada para tratamento e disposição final. Visando esta aplicação, independente do coeficiente de rendimento celular, a principal resposta avaliada deve ser a redução do descarte ou a taxa de produção de lodo, desde que a eficiência do sistema se mantenha.

A elevada variabilidade nos resultados obtidos demonstra a necessidade de estudos mais completos, de modo a verificar interações entre as diversas variáveis capazes de influenciar o processo. Além disso, utilizou-se o dnP como exemplo para demonstrar a variabilidade dos resultados, que é uma substância química de composição definida e que não sofre grandes

transformações ao longo do tempo de estocagem. O mesmo não ocorre com biossurfactantes, cujas particularidades de cada lote produzido também podem influenciar os resultados. Deste modo, a garantia de reprodutibilidade dos resultados é fundamental antes de se dar continuidade ao estudo para avaliar o mecanismo de ação e a melhor condição de operação para redução do descarte de lodo, sendo este o objetivo deste capítulo.

Figura 10 – Correlações observadas no levantamento bibliográfico sobre adição de dnP em lodos ativados.



Fonte: elaboração própria com dados disponíveis em (A) Alexandre (2013) e (B) Chen *et al.* (2008).

## 6.2 Metodologia

Nesta etapa foram realizadas diversas operações, partindo, em momentos diferentes, de lodo proveniente de um sistema de lodos ativados em operação em refinaria de petróleo. As particularidades de cada operação, denominadas Operação 2, Operação 3 e Operação 4, estão descritas nos Apêndices B, C e D, respectivamente.

A operação dos biorreatores em bateladas sequenciais seguiu a metodologia descrita no item 5, com algumas modificações. O efluente sintético foi retirado da composição da alimentação, que passou a ser constituída apenas por efluente de refinaria (água ácida), diluído em água destilada quando necessário para manter DQO 1000 mg/L. A alimentação foi suplementada com nitrogênio e fósforo (DQO:N:P de 100:5:1) e, a partir da Operação 3, a espuma passou a ser mantida dentro do biorreator Teste através de controle manual da vazão de ar introduzido no biorreator.

Na Operação 3, avaliou-se também a adição de glicose no Controle em alguns períodos de operação como forma de ajustar a carga orgânica, pois o biorreator Teste recebia 1,7 vezes mais DQO em decorrência da adição de RL. Para isso, preparava-se uma solução estoque de glicose de modo que ela apresentasse a mesma DQO do produto. Assim, adicionava-se o mesmo volume em ambos os biorreatores, sendo que o Controle recebia glicose, e o Teste, biossurfactante.

Os métodos analíticos encontram-se descritos no Apêndice A.

## 6.3 Resultados e discussão

Vários experimentos foram conduzidos com biorreatores operando em bateladas sequenciais, com períodos sem e com adição de biossurfactante na concentração determinada no experimento de varredura de concentração (50 mg RL/L, item 5). Após um período de adaptação do lodo às condições de operação e aos constituintes da alimentação, e após verificada a estabilização da redução de DQO e da concentração de SST nos biorreatores, iniciava-se a adição de biossurfactante no biorreator Teste a cada troca de meio. Os principais resultados encontram-se resumidos na Tabela 14.

Enquanto no item 5 a concentração de sólidos se manteve praticamente constante ( $2803 \pm 94$  mg SST/L) durante os primeiros 7 dias de operação com adição de 50 mg RL/L, na Operação 2, após 2 dias de adição do produto observou-se queda de 52% na concentração de SST do

biorreator Teste (3368 para 1616 mg SST/L nos dias 1 e 3, respectivamente). Em ambos os casos (experimentos do item 5 e da Operação 2), a adição de RL se deu na mesma concentração (50 mg RL/L) e relação produto/biomassa (15 e 18 mg RL/g SST). Tais resultados indicam que o lote de biossurfactante utilizado nesta etapa (lote 6) apresentou comportamento diferente dos anteriores. Além disso, uma intensa formação de espuma (visualmente diferente da espuma na operação anterior), também retirada do reator na Operação 2, provavelmente levou à perda significativa de sólidos. Assim, a redução de 56% no descarte de lodo ( $68 \pm 9$  mg SST/d no Controle e  $30 \pm 19$  mg SST/d no Teste) pode não ser resultado direto da adição de RL, mas da perda de sólidos com a espuma.

Tabela 14 – Principais resultados da adição de ramnolipídeo em lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais.

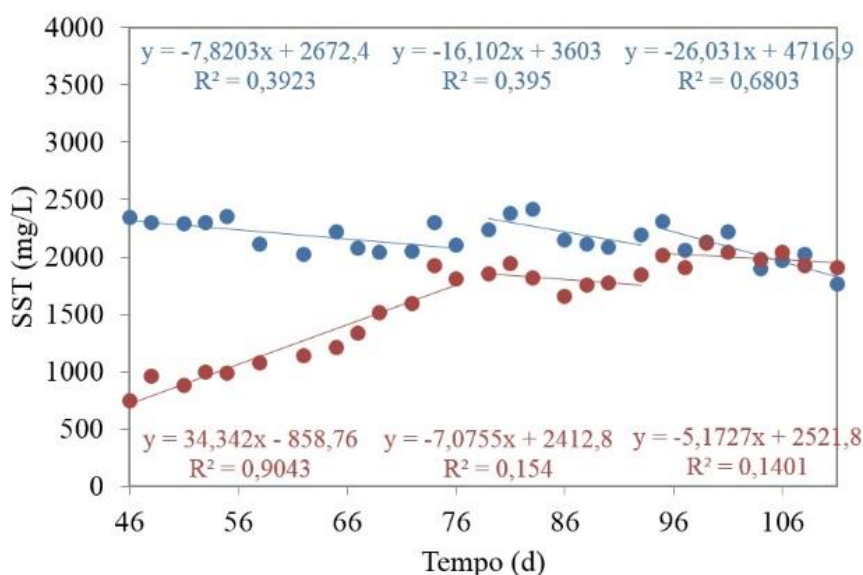
Operação	RL (mg/L) <sup>(a)</sup>	Glicose (mg/L) <sup>(b)</sup>	Efluente <sup>(c)</sup>	TRH (h)	Redução no descarte (%)
2 <sup>(d)</sup> (lote 6)	50	0	Sintético (1 a 36) <sup>(e)</sup> Real (37 a 44)	5,5	56*
	50	0	Real (1 a 27)	5,5	-77*
	50	0	Real (28 a 78)	24	-61*
3 (lote 7)	50	228	Real (79 a 111)	24	20*
	50	228	Real (112 a 138)	5,5	53*
	10	46	Real (139 a 156)	5,5	30*
	25	114	Real (157 a 180)	5,5	18*
4 (lote 10)	10	0	Real (1 a 24)	5,5	-4
	25	0	Real (25 a 50)	5,5	-17*
4 (lote 11)	10	0	Real (1 a 24)	5,5	-32*
	25	0	Real (25 a 50)	5,5	-85*

Fonte: elaboração própria. Operação: TRS 20 d, TRH 5,5 h (reciclo 1) ou 24 h (sem reciclo). <sup>(a)</sup>Concentração no reator. <sup>(b)</sup>Adição de glicose no biorreator Controle de modo a adicionar DQO equivalente a do RL. <sup>(c)</sup>Efluente sintético corresponde à mistura da Tabela 10. Efluente real corresponde à corrente água ácida diluída para DQO 1000 mg/L, suplementada com N e P. <sup>(d)</sup>Retirada de espuma do sistema. <sup>(e)</sup>Período de operação, em dias. \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).

A suspensão da adição de RL no biorreator Teste da Operação 2 foi realizada para verificar se o sistema recuperava a concentração de SST obtida em período anterior à adição, no mesmo patamar da concentração medida no biorreator Controle. Na Figura 11 é apresentado o comportamento da biomassa (concentração de SST) nos biorreatores a partir da suspensão da adição de RL no Teste. Enquanto a concentração de SST no Controle apresentou uma variação muito pequena ( $-7,8$  mg SST/L.d;  $R^2$  0,3923), no biorreator Teste a concentração de SST apresentou uma variação maior e positiva de  $34$  mg SST/L.d ( $R^2$  0,9043). Ao final desta operação (dias 95 a 111), as concentrações de SST nos dois biorreatores praticamente se igualaram, verificando-se médias de  $2046 \pm 176$  mg SST/L (Controle) e  $1991 \pm 77$  mg SST/L (Teste). Estes resultados indicam que a suspensão da adição de RL permite que o sistema

retorne às concentrações de lodo anteriores à adição. O mesmo ocorreu em um sistema de lodos ativados de laboratório após a suspensão da adição de surfactante químico (WYRWAS, KRUSZELNICKA E GINTER-KRAMARCZYK, 2011). Esse resultado é importante quando se pensa em uma aplicação industrial. Se o produto adicionado apresentar efeito de indução do crescimento no sistema ou se a biomassa se adaptar ao produto levando à perda do efeito, pode-se suspender sua adição e permitir a recuperação da biomassa. Além disso, produtos diferentes podem levar a resultados diferentes, alterando a população microbiana. Caso haja adaptação ou seleção da biomassa, outro produto, com diferentes características, pode ser utilizado, de forma a manter uma redução contínua de descarte de lodo.

Figura 11 – Variação da concentração de SST com o tempo após suspensão da adição de RL em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo.



Fonte: elaboração própria. Em azul (●), dados do biorreator Controle e em vermelho (●), dados do biorreator Teste.

Na Operação 3, a adição de 50 mg RL/L no biorreator Teste, operando na mesma condição do biorreator Teste da Operação 2, induziu o crescimento da biomassa (Tabela 14), acarretando descarte 77% maior que no Controle ( $34 \pm 3$  mg SST/d no Controle e  $60 \pm 10$  mg SST/d no Teste). Quando se obteve reduções de 52% (item 5) e 56% (Operação 2) no descarte de lodo com 50 mg RL/L ou 25 mg RL/g SST, a espuma formada após adição de RL era retirada do biorreator, fazendo com que a concentração de ramnolipídeos no biorreator Teste fosse menor que a adicionada a cada troca de meio. Ao manter a espuma dentro do biorreator na Operação 3, as concentrações de ramnolipídeo no biorreator Teste se mantiveram em 50 mg/L.



Além disso, ao não ser retirado do sistema, o RL pode ter sido utilizado como substrato pelas células, contribuindo para um maior crescimento da biomassa. A cada 390 mL de alimentação com DQO 1000 mg/L adicionada aos biorreatores, adicionava-se 390 mg de DQO. No entanto, a adição de 6 mL de RL do lote 7 (DQO 21250 mg/L) no biorreator Teste, levava a uma adição extra de 128 mg DQO a cada troca de meio. Ou seja, o biorreator Teste era alimentado com 1,7 vezes mais matéria orgânica que o biorreator Controle.

Liwarska-Bizukojs e Bizukojs (2006) observaram que reatores operando em regime contínuo com baixas taxas de diluição (TRH alto) apresentaram concentrações de SSV maiores quando 250 mg/L de surfactantes químicos (quantificados como MBAS<sup>5</sup>) eram adicionados na alimentação, pois eram utilizados como fonte de carbono adicional pelas células. Este resultado seria um indício de que o biossurfactante pode induzir o crescimento da biomassa, quando adicionado sob determinadas condições.

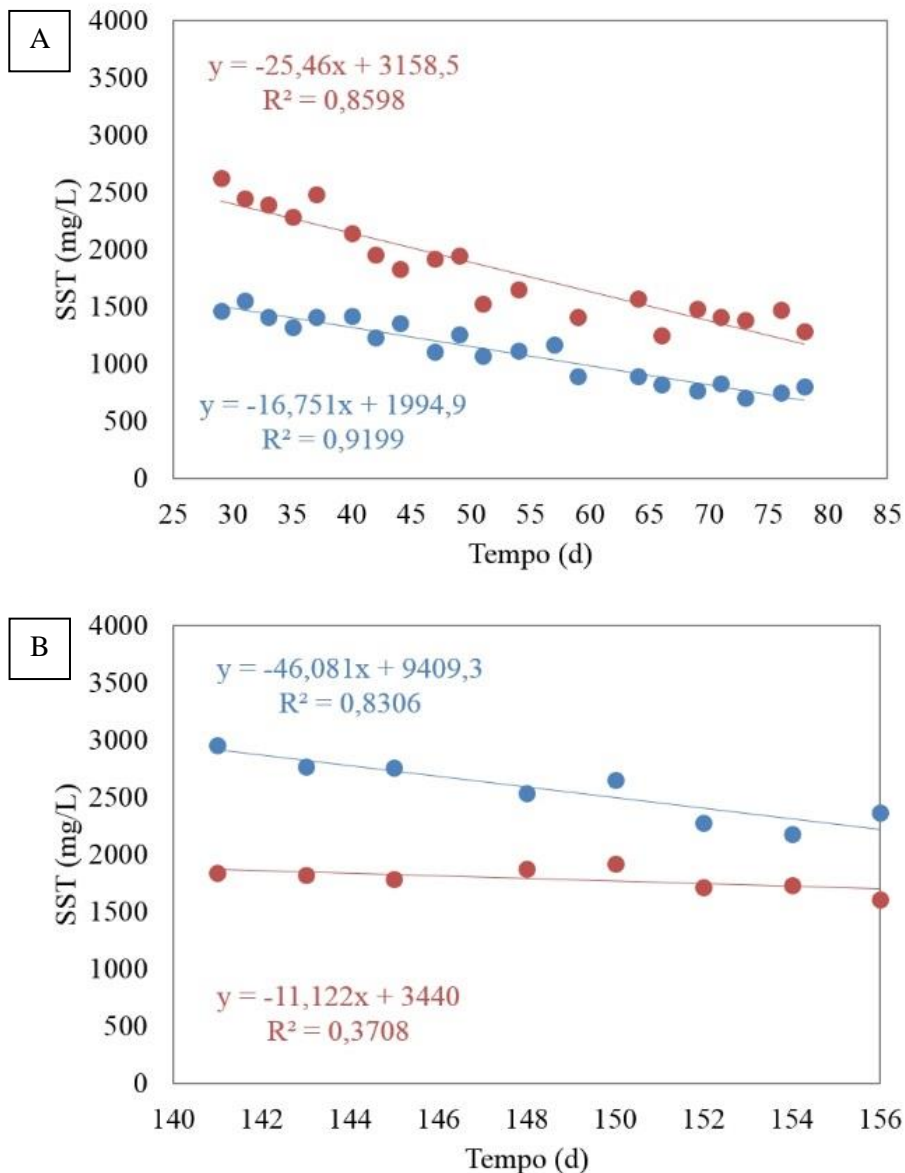
De modo a verificar se menores cargas de ramnolípídeo levariam a um menor fornecimento de substrato adicional, menor interferência nos resultados obtidos e à reprodução dos valores obtidos anteriormente (reduções de descarte de lodo da ordem de 50%), o TRH foi aumentado para 24 h em ambos os reatores em um segundo período da Operação 3. Como a carga orgânica aplicada foi reduzida com esta modificação, a concentração de SST sofreu redução nos dois biorreatores, como apresentado na Figura 12A. As concentrações médias de SST no período ainda indicaram aumento de 61% no descarte de lodo (Tabela 14), porém a velocidade de redução da concentração de SST no biorreator Teste foi 1,5 vezes maior que no Controle, indicando que a redução da carga de RL levou ao efeito desejado (Figura 12A).

Como o biorreator Teste recebia 1,7 vezes mais matéria orgânica que o Controle devido à adição de 50 mg RL/L, uma solução de glicose foi adicionada ao biorreator Controle de modo que este recebesse a mesma quantidade de matéria orgânica que o biorreator Teste. Apesar de não ser um modo de operação representativo de um sistema real, principalmente por ser uma molécula altamente disponível para as células, a adição de glicose foi um meio de se levantar mais informações sobre o efeito da adição do biossurfactante. Ao compensar a carga orgânica adicional, foi possível observar a redução no descarte de lodo do biorreator Teste: 20% (TRH 24 h) e 53% (TRH 5,5 h) menor que no Controle (Tabela 14).

---

<sup>5</sup> MBAS: substâncias ativas ao azul de metileno, do inglês.

Figura 12 – Variação da concentração de SST com o tempo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo.



Fonte: elaboração própria. Em azul (●), dados referentes ao biorreator Controle e em vermelho (●), biorreator Teste. (A) Determinação da variação de SST com o tempo após o aumento do TRH para 24 h na Operação 3. (B) Determinação da variação de SST com o tempo após redução da concentração de biosurfactante na Operação 3.

Na Operação 3, além do lote de RL ser diferente (lote 7) e do fato de a espuma ter sido mantida dentro do biorreator Teste, outro fator pode ter contribuído para os resultados obtidos: o método de quantificação de ramnolipídeos no caldo bruto livre de células foi alterado. Até então, a quantificação era feita pelo método do orcinol, sendo alterado para HPLC a partir do emprego do lote 7. Quando se quantifica a ramnose no meio de cultivo pelo método do orcinol sem uma etapa de extração, a concentração de RL é superestimada quando comparada aos valores obtidos por HPLC, que é uma análise de maior precisão (BALLOT, 2009). Desta forma, quando o RL apresentou 52% de redução (item 5), a concentração efetiva dentro do biorreator seria menor

que 50 mg RL/L, tanto pela retirada de espuma quanto pelo método de quantificação utilizado. Por isso, avaliou-se também as concentrações de 10 e 25 mg RL/L.

Os valores médios de descarte de lodo indicam 30% de redução na concentração de 10 mg RL/L (Tabela 14). Porém, deve-se considerar que o biorreator Teste já apresentava valores mais baixos de SST, decorrentes de modificações de operação dos períodos anteriores. Conforme observado na Figura 12B, a concentração de SST reduziu a uma taxa de 46 mg SST/L.d ( $R^2$  0,8306) no biorreator Controle, porém manteve-se muito menor no biorreator Teste, indicando que o RL não apresentou o efeito esperado de redução de lodo. O aumento na concentração de RL para 25 mg RL/L acarretou 18% de redução no descarte de lodo (Tabela 14), porém os resultados obtidos foram muito próximos aos do biorreator Controle, com exceção dos últimos pontos analisados (conforme pode-se observar na Figura 25, no Apêndice C).

Outra consideração a ser feita é que as condições de fermentação de *P. aeruginosa* visando à produção de ramnolipídeos devem ser bem controladas, pois podem levar a diferentes misturas de congêneres e homólogos (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). Diferentes proporções de MRL e DRL acarretam diferentes efeitos na biomassa estudada. O aumento da fração de MRL, por exemplo, é capaz de aumentar o índice de emulsificação e a propriedade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativa (DAS, YANG E MA, 2014).

Este fato pode ser melhor observado quando se analisa os resultados da Operação 4. Ambos os lotes avaliados, 10 e 11, foram produzidos simultaneamente, porém em frascos agitados e em fermentador de bancada, respectivamente. As cinéticas de produção de RL e crescimento microbiano foram diferentes, conforme apresentado no Apêndice D. Mesmo avaliando as mesmas concentrações de RL nos sistemas de lodos ativados, a resposta foi significativamente diferente, conforme observado na Tabela 14.

Até então, o foco da pesquisa eram fatores quantitativos do biossurfactante, avaliando sua concentração e a relação produto/biomassa. Porém, ao longo deste estudo, diversas condições de fermentação foram utilizadas, o que pode ter sido determinante na obtenção de resultados variáveis, conforme apresentado no item 6.4 a seguir. Além de diferentes proporções de congêneres, o fato de se utilizar o caldo bruto livre de células também pode ter influenciado os resultados devido à presença de compostos orgânicos além do RL, como glicerol residual da fermentação, por exemplo.

#### 6.4 Comparação de todas as operações em sistema de lodos ativados

Quando se comparam todos os resultados obtidos na operação dos biorreatores (Operações 1, 2, 3 e 4), algumas correlações podem ser observadas, conforme apresentado na Figura 13.

A redução do descarte de lodo não se correlaciona com a concentração de ramnolípídeos no biorreator ( $R^2$  0,0407, Figura 13A), mas sim com a relação produto / biomassa ( $R^2$  0,3924 - linear,  $R^2$  0,5533 - exponencial, Figura 13B). Quanto maior a relação, menor o descarte de lodo obtido.

Outra variável que se mostrou importante na obtenção dos resultados é a relação  $S_0/X_0$ . O aumento desta relação no biorreator Teste sem considerar a DQO adicional do biossurfactante reduz o descarte de lodo ( $R^2$  0,7789, Figura 13C). Este comportamento já era esperado, pois se observam maiores valores do coeficiente de rendimento celular quando a relação  $S_0/X_0$  é mais baixa devido a desacoplamento energético (LIU, 1996). A curva obtida tem perfil semelhante ao estudo de Liu (1996). Quando se considera a DQO do biossurfactante no cálculo da relação  $S_0/X_0$ , o fator de correlação diminui ( $R^2$  0,4622, Figura 13D), o que pode indicar que, nos testes realizados, a relação  $S_0/X_0$  teve maior participação na redução do descarte do que o biossurfactante. Contudo, não se pode descartar um efeito sinérgico.

Vale ressaltar que as variações obtidas na relação  $S_0/X_0$  foram decorrentes da própria operação dos biorreatores, que estabilizavam em valores de SST diferentes a cada nova partida do sistema, apesar de se manter a mesma concentração inicial de biomassa e DQO de alimentação.

Na Figura 13E observa-se que os valores de IVL no biorreator Teste foram mais baixos que no Controle na maioria dos períodos avaliados, apresentando correlação de 44% com a relação produto/biomassa (Figura 13F). Liwarska-Bizukojc e Bizukojc (2006) também observaram variação nos valores de IVL de biorreatores operando com adição de surfactantes químicos aniônicos. O aumento da taxa de diluição reduziu os valores, que atingiram patamar abaixo do reator Controle. Logo, deve-se avaliar também o efeito do biossurfactante nas características de sedimentação do lodo, de modo a evitar prejuízo no processo.

Figura 13 – Correlações observadas na condução de lodos ativados em bateladas sequenciais.

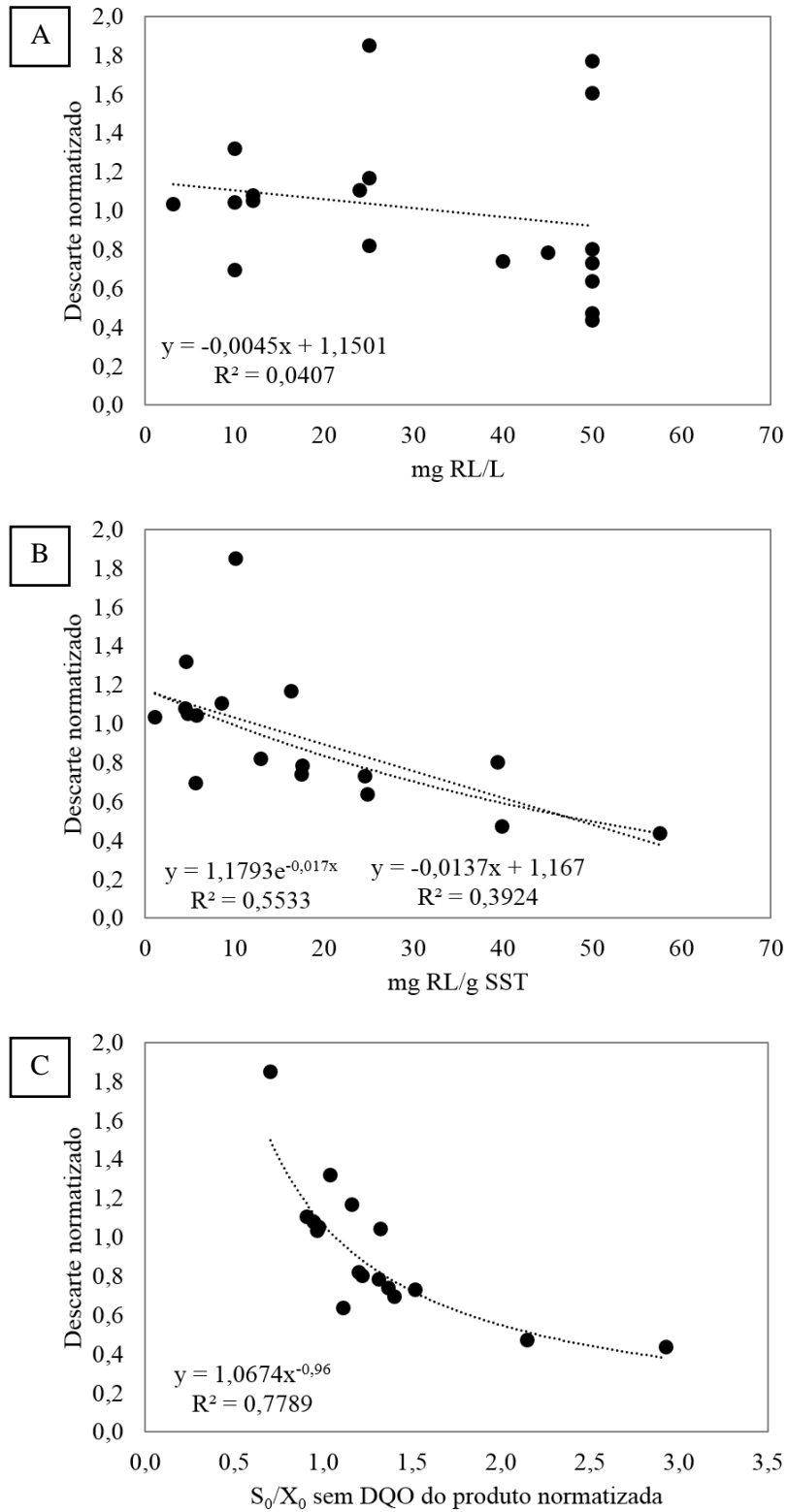
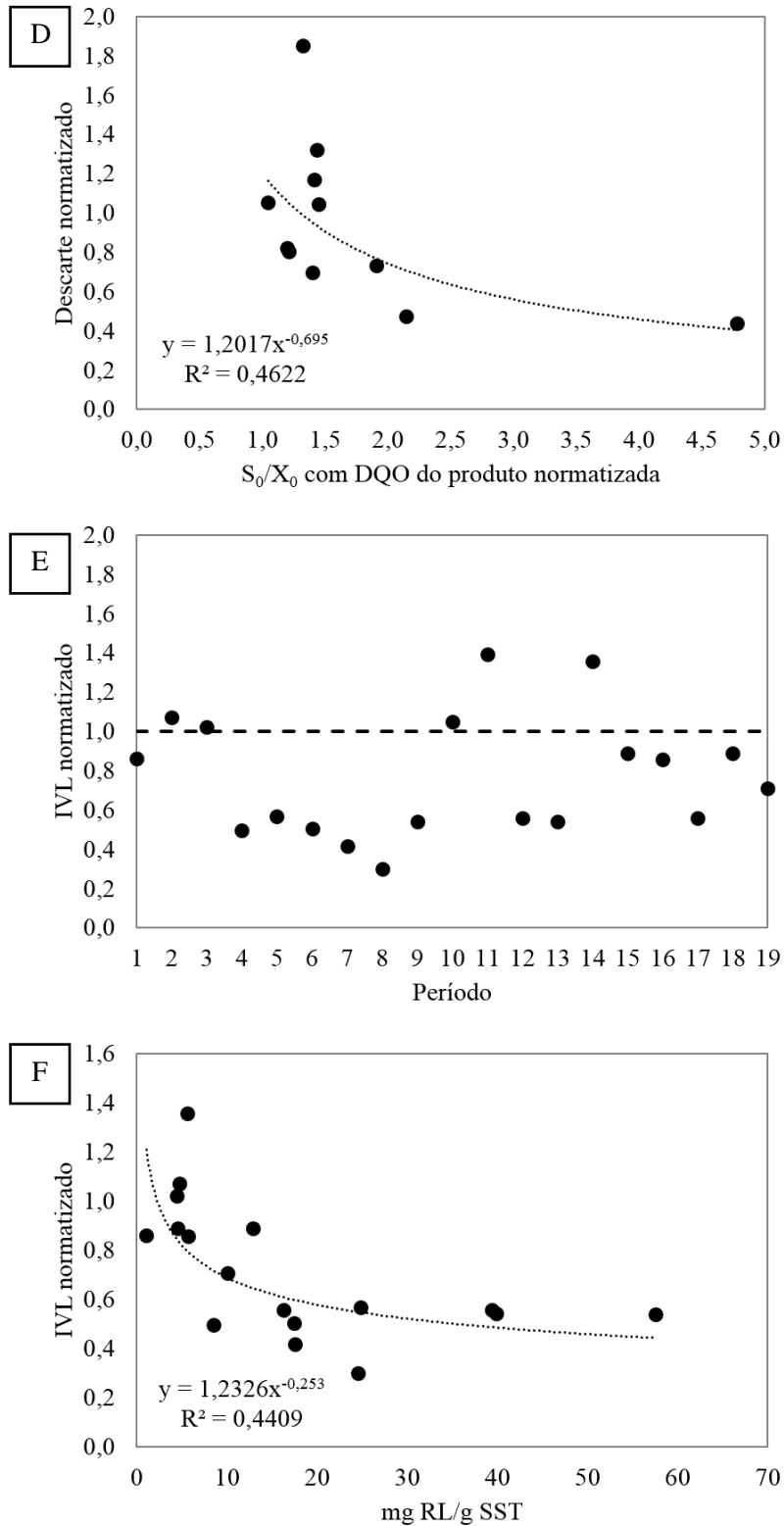


Figura 13 – Correlações observadas na condução de lodos ativados em bateladas sequenciais (cont).



Fonte: elaboração própria. Cada ponto nos gráficos corresponde ao resultado de um período de operação do biorreator Teste, envolvendo todas as corridas realizadas (itens 5 e 6). Linhas pontilhadas correspondem a linhas de tendência e linha tracejada corresponde aos valores do Controle. Valores normalizados correspondem à relação Teste/Controle.

A Operação 1 (item 5) foi a que levou a melhores resultados, com um máximo de 52% de redução no descarte de lodo. O principal diferencial observado em relação a todos os outros períodos está na alimentação, que era composta por efluente sintético. De 1000 mg/L de DQO da alimentação, 50% eram oriundos de efluente sintético (Tabela 11). Apesar deste apresentar compostos tipicamente encontrados nos efluentes de refinaria de petróleo (BROOKES, 2005), 87% da DQO teórica do efluente sintético era oriunda de etanol, fazendo com que aproximadamente 40% da matéria orgânica adicionada aos biorreatores fosse etanol, levando a concentrações entre 68 (1ª troca) e 135 mg/L (2ª troca) no volume útil do biorreator. O etanol é uma molécula com elevada permeabilidade nas membranas de bactérias e, quando acumulado no meio, pode promover a liberação de nutrientes e a redução do crescimento celular (INGRAM, 1990; OSMAN E INGRAM, 1985). No entanto, nas concentrações utilizadas tal efeito é improvável. Além disso, se a redução do crescimento fosse decorrente apenas do uso de etanol na alimentação, o mesmo resultado teria sido observado no Controle.

Pode-se supor, então, um efeito combinado entre etanol e o biossurfactante. Por ser um composto altamente biodisponível, nas concentrações utilizadas pode ter feito com que a biomassa ficasse mais ativa, levantando também a hipótese de que o efeito do biossurfactante é dependente da atividade celular, devendo ser avaliado em outras condições de operação dos biorreatores.

Chen *et al.* (2008) estudaram o efeito do TRS (10 a 30 d) na produção de lodo de um sistema de lodos ativados operando em bateladas sequenciais com e sem adição de dnP. A maior redução na produção de lodo foi obtida no sistema operando com TRS 10 d (7,84 g SST/d no Controle e 5,47 g SST/d no Teste), reforçando a hipótese de que o efeito do biossurfactante pode ser mais pronunciado sob condições de operação que aumentem a atividade da biomassa.

## 6.5 Conclusões

A não reprodutibilidade dos resultados pode ser decorrente do lote de biossurfactante, que varia em função das condições de fermentação e manutenção do inóculo. Além do fato de ter sido utilizado caldo bruto livre de células, fazendo com que outras substâncias, que não o ramnolípido, possam ter mascarado ou suprimido o efeito. As características do substrato utilizado e as condições de operação do sistema também podem ter influenciado as respostas obtidas.

Há indícios de que o aumento da relação produto/biomassa reduz o descarte de lodo. Maiores reduções no descarte de lodo foram obtidas com os maiores valores de  $S_0/X_0$ , devendo-se avaliar a existência de um efeito sinérgico entre biossurfactante e a relação  $S_0/X_0$ . O efeito do biossurfactante do tipo ramnolipídeo também pode estar associado ao estado fisiológico das células, devendo este ser avaliado em diferentes condições de operação.



## 7 Efeito de diferentes congêneres de ramnolipídeo sobre o metabolismo microbiano

### 7.1 Introdução

Uma das linhas de pesquisa relacionada à aplicação de biossurfactantes está associada à sua atividade antimicrobiana (ARAUJO *et al.*, 2016). Ramnolipídeos, em especial, têm mostrado resultados notáveis, com efeito já comprovado em bactérias Gram positivo e Gram negativo, fungos filamentosos, leveduras, algas e até vírus, atingindo um estágio de desenvolvimento em que passam a ser produzidos como antibióticos comerciais (BALLOT, 2009; LOTFABAD, SHAHCHERAGHI E SHOORAJ, 2013; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

A Tabela 15 apresenta alguns valores de concentração mínima inibitória (CMI) encontrados na literatura para diferentes ramnolipídeos, sendo possível observar a elevada variabilidade obtida. Isso ocorre porque o tipo de mistura de ramnolipídeos e seu grau de pureza, a espécie microbiana, bem como o tipo de teste utilizados e suas condições influenciam os resultados (BALLOT, 2009). No caso de *E. coli* e *S. epidermis*, por exemplo, observam-se valores que variam de 4 a 250 mg/L e 8 a 250 mg/L, respectivamente.

Em geral, as diferenças observadas são decorrentes da proporção de congêneres na mistura de ramnolipídeos. No estudo de Das, Yang e Ma (2014), observa-se que o aumento da fração de MRL reduziu o valor de CMI (Tabela 15), indicando maior efeito na inibição microbiana. Os autores também avaliaram a zona de inibição de crescimento (ZOI) de *E. coli* em placas com o teste de difusão em ágar. Quando o teste era realizado com uma mistura de MRL:DRL de 0:6, o valor de ZOI era de 12 mm. Este valor aumentou gradativamente com o aumento da fração de MRL, chegando a 30 mm com as misturas 5:1 e 6:0. Os autores concluíram que a fração MRL apresentava papel fundamental no potencial antimicrobiano do biossurfactante. Ballot (2009) obteve resultado semelhante. O biossurfactante produzido por uma cepa de *P. aeruginosa* que produz apenas o congêneres MRL gerou uma ZOI (com *Mycobacterium aurum*) de 31 mm, contra apenas 17,5 mm quando o produto era produzido por uma cepa que gerava uma mistura desconhecida de congêneres.

Comparando-se os resultados de Haba *et al.* (2003) e Benincasa *et al.* (2004) para cada microrganismo na Tabela 15, percebe-se que uma maior concentração de MRL acarreta CMI mais baixa, indicando maior efeito antimicrobiano (*B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. thyphimurium*). Porém, este resultado não pode ser generalizado, conforme observado com *E.*

*coli*, *S. epidermidis* e *M. luteus*, comprovando que a espécie microbiana avaliada também exerce papel fundamental nos resultados obtidos. Como a população microbiana sofre alterações sob diferentes condições de operação nos sistemas de lodos ativados (PAUL E LIU, 2012), além da mistura de ramnolipídeos, as condições de operação também devem alterar os resultados.

Tabela 15 – Atividade antibacteriana de biossurfactantes do tipo ramnolipídeo.

MRL: DRL <sup>(a)</sup>	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>(b)</sup>	Ref.	MRL: DRL <sup>(a)</sup>	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>(b)</sup>	Ref.
<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
1:5	32	(1)	1:5	30	(1)
1:1	4	(1)	1:1	16	(1)
1:3	16	(1)	1:3	16	(1)
— <sup>(c)</sup>	30	(1)	—	25	(1)
1:2 <sup>(d)</sup>	64	(2)	1:2 <sup>(d)</sup>	32	(2)
2:1 <sup>(d)</sup>	250	(3)	2:1 <sup>(d)</sup>	8	(3)
—	32	(4)	—	128	(4)
<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
1:5	16	(1)	1:2 <sup>(d)</sup>	32	(2)
1:1	4	(1)	2:1 <sup>(d)</sup>	250	(3)
1:3	6	(1)	—	8	(4)
—	10	(1)	<i>Salmonella thyphimurium</i>		
1:2 <sup>(d)</sup>	16	(2)	1:2 <sup>(d)</sup>	128	(2)
2:1 <sup>(d)</sup>	8	(3)	2:1 <sup>(d)</sup>	16	(3)
—	64	(4)	—	128	(4)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027			<i>Micrococcus luteus</i>		
1:2 <sup>(d)</sup>	256	(2)	1:2 <sup>(d)</sup>	64	(2)
2:1 <sup>(d)</sup>	32	(3)	2:1 <sup>(d)</sup>	128	(3)
—	> 256	(4)	—	32	(4)

Fonte: elaboração própria, com dados disponíveis em (1) Das; Yang; Ma (2014), (2) Haba et al. (2003), (3) Benincasa et al. (2004) e (4) Abalos et al. (2001). <sup>(a)</sup>Proporção de MRL e DRL na mistura de biossurfactantes. <sup>(b)</sup>Referência (1) utilizou valores de CMI<sub>50</sub> (inibição de 50% do crescimento), enquanto as outras utilizaram inibição de crescimento visível. <sup>(c)</sup>Não disponível. <sup>(d)</sup>Valor aproximado, com base nos percentuais fornecidos na tabela da referência.

Com exceção do estudo de Das, Yang e Ma (2014), todas as referências na Tabela 15 utilizaram soluções purificadas de biossurfactante. Diversas cepas de *Pseudomonas*, inclusive *P. aeruginosa*, são capazes de produzir fenazina, um antibiótico heterocíclico de amplo espectro (PERNEEL *et al.*, 2008; PIERSON E PIERSON, 2010). Ramnolipídeos e fenazina apresentam efeito sinérgico na inibição do crescimento de fungos (PERNEEL *et al.*, 2008), podendo apresentar o mesmo efeito no crescimento de bactérias. Por isso, deve-se dar preferência ao uso de soluções purificadas de biossurfactante (BALLOT, 2009).

Assim como no caso de crescimento de culturas puras, a proporção de MRL e DRL deve influenciar os resultados obtidos em sistemas de lodos ativados. Portanto, o objetivo principal deste item foi avaliar o efeito desta proporção na mistura de congêneres na redução do

crescimento microbiano em teste rápido. Para tal, foram utilizados produtos com elevado grau de pureza com o intuito de evitar o efeito de interferentes de outras substâncias no processo. Como objetivo secundário, pretendia-se determinar as condições de teste em que se obtém a maior redução no descarte de lodo.

Como o teste Tipo II (Quadro 2) não se mostrou adequado (conforme resultados apresentados no item 4), a avaliação de diferentes proporções de congêneres no crescimento microbiano foi feita por meio da utilização do teste Tipo III, bastante comum no estudo de desacopladores metabólicos. Apesar de ser bastante simples, não é um teste padronizado: o tempo de reação varia de 3 a 9 h, a fonte de carbono pode ser tão simples como acetato de sódio, quanto mais complexa, como amido, e a relação  $S_0/X_0$  varia de 0,12 a 2 (CHEN, MO E LIU, 2002; CHEN *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2013; YANG, XIE E LIU, 2003). Por isso, foram avaliadas diferentes condições, conforme apresentado a seguir.

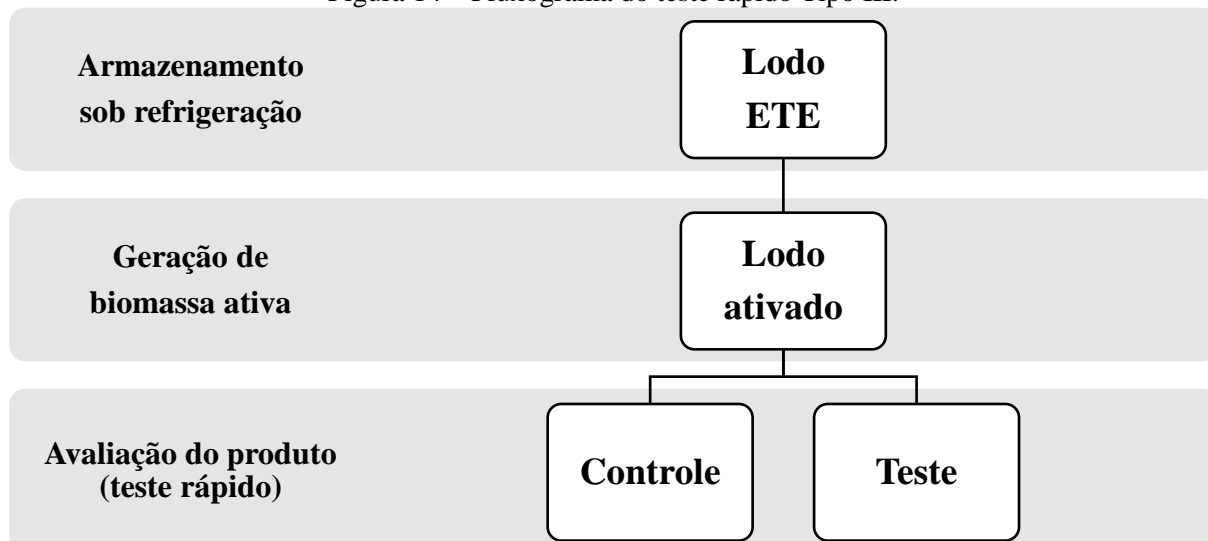
## 7.2 Procedimento experimental

A Figura 14 apresenta um fluxograma esquemático do teste Tipo III (Quadro 2) utilizado. O lodo foi coletado em uma ETE localizada no município do Rio de Janeiro e armazenado sob refrigeração até o momento do uso. O lodo era então submetido a uma etapa prévia para ativação da biomassa (melhor descrita nos itens 7.2.1 e 7.2.2), pois a atividade microbiana era reduzida devido às baixas temperaturas do armazenamento. Em seguida, o teste rápido propriamente dito era conduzido para avaliação do efeito do produto em questão (Teste), sempre com um Controle (sem adição de produto) em paralelo para avaliação do efeito.

O teste rápido foi conduzido em batelada, usando bécheres de vidro de 1 L com 600 mL de volume útil, consistindo de 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L e pH 7 (MORITA E ASSUMPCÃO, 2007), volume apropriado de inóculo para a concentração inicial de SST desejada, volume apropriado de alimentação (solução de glicose ou meio TSB 30 g/L) para a DQO inicial desejada, e água destilada para completar o volume útil. Volume apropriado de solução estoque de produto era adicionado nos reatores Teste e, para cada condição Teste, um experimento Controle era conduzido em paralelo, sem adição de produto. Todos os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente (19-22°C ao longo de 12 h; 19-28°C ao longo de 24 h), com agitação magnética e aeração realizada por introdução de ar através de difusor poroso cilíndrico com 3,5 cm (comprimento) x 1 cm (diâmetro) localizado no fundo dos biorreatores. O fluxo de ar era controlado manualmente de modo que a espuma gerada em

decorrência da adição de biossurfactante se mantivesse dentro dos reatores, garantindo OD de pelo menos 0,5 mg/L. Nos experimentos Controle, vazões semelhantes eram aplicadas, de modo que as concentrações de OD em todas as condições fossem semelhantes.

Figura 14 – Fluxograma do teste rápido Tipo III.



Fonte: elaboração própria.

A cada hora, durante 4 h, 25 mL de amostra eram retirados para análise de SST e DQO solúvel para determinação de  $Y_{X/S}$  e da taxa de consumo de substrato ( $k$ ). Após 30 h de reação, a taxa específica de consumo de oxigênio exógena ( $SOUR_{ex}$ ) foi determinada através da mistura de 10 mL de solução de acetato de sódio (0,3 mol/L) com 290 mL de licor misto de cada condição. Os métodos analíticos estão descritos no Apêndice A.

As amostras retiradas dos reatores nos tempos específicos eram filtradas em membrana de fibra de vidro para quantificação de sólidos suspensos (em duplicata) e, em seguida, o líquido era novamente filtrado em membrana de celulose de 0,45  $\mu$ m para determinação da DQO solúvel. Imediatamente após a última filtração, adicionava-se  $H_2SO_4$  concentrado (1 gota/5mL de amostra) nas amostras para reduzir o pH, eliminando a possibilidade de haver atividade microbiana até o momento da análise de DQO.

O coeficiente de rendimento celular era calculado conforme Equação (3), sendo:

- $X_0$ : concentração de biomassa inicial (mg SST/L);
- $X_4$ : concentração de biomassa após 4 h de reação (mg SST/L);
- $S_0$ : concentração de substrato inicial (DQO solúvel, mg/L), e
- $S_4$ : concentração de substrato após 4 h de reação (DQO solúvel, mg /L).

Alguns experimentos precisaram ser conduzidos com volume útil reduzido devido à quantidade de produto disponível (item 7.2.2.3 e 7.3.2.3), por isso foi utilizado erlenmeyer de 125 mL (escala de graduação, porém volume total maior), com 125 mL de volume útil inicial, mantendo-se as respectivas proporções. Neste caso, a aeração foi feita sem o difusor poroso, minimizando problemas com espuma e sendo suficiente para garantir OD nos reatores (pelo menos 1,0 mg/L). Como o volume era reduzido, só foram analisadas amostras retiradas nos tempos 0 h e 4 h, portanto,  $k$  não foi quantificado nesses casos.

### **7.2.1 Procedimento 1**

Para ativação da biomassa, lodo e alimentação eram misturados, de modo que volume útil do reator apresentasse inicialmente 2000 mg SST/L e DQO 1000 mg/L. Após aeração por 23 h, um volume apropriado de licor misto era utilizado como inóculo no teste rápido. A condição inicial utilizada no teste rápido foi 500 mg SST/L e DQO 1000 mg/L.

Nesta etapa, foram avaliados dois tipos de alimentação: uma solução de glicose e uma solução do meio TSB. Para avaliar a adequação do teste, utilizou-se 2,4-dinitrofenol (Vetec, grau indicador, solução estoque 0,4 g/L) como produto modelo em concentrações de até 20 mg dnP/L.

### **7.2.2 Procedimento 2**

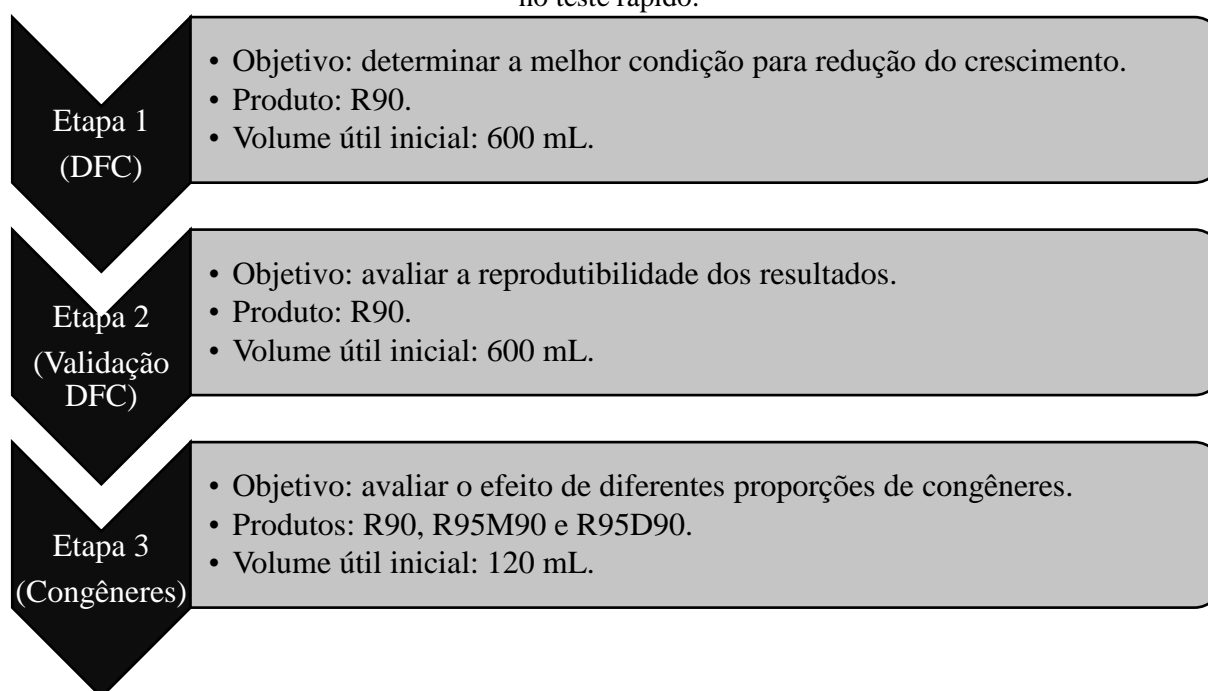
Este procedimento diferiu do anterior apenas nas condições da etapa de ativação da biomassa e no produto utilizado no teste rápido propriamente dito. Foram utilizados biossurfactantes do tipo ramnolípídeo comerciais com elevado grau de pureza (R90, R95M90 e R95D90, descritos na Tabela 3). Utilizou-se solução estoque contendo 40 g<sub>(massa úmida)</sub> produto/L para todos os produtos. No caso do R90, isso equivale a 22,5 g RL/L (considerando fator 0,4489 g ramnose/g RL).

Um RBS foi mantido em operação à temperatura ambiente (19-28°C) para que o licor misto pudesse ser utilizado como inóculo nos experimentos. O reator consistia de uma caixa de acrílico com 5 mm de espessura e 20 x 20 x 20 cm, com 5 L de volume útil. Ar comprimido era introduzido no sistema através de um difusor trapezoidal de 10 (comprimento) x 2 (base) x 2 cm (altura) localizado no centro do reator para garantir a homogeneidade do sistema e concentrações de oxigênio dissolvido (OD) de pelo menos 4 mg/L. Lodo oriundo de ETE

armazenado sob refrigeração foi utilizado na partida dos reatores, que se deu com 2000 mg SST/L. O meio (2,6 L) era trocado duas vezes ao dia, pela manhã e 8 h depois. A alimentação consistia em meio TSB (DQO 1000 mg/L) e  $\text{NaHCO}_3$  (0,9 g/L) para manter o pH em torno de 7 no reator. Para evitar mudanças significativas no consórcio microbiano, fixou-se a operação em no máximo 30 dias, e nenhum experimento era conduzido durante a primeira semana de operação, de modo a permitir adaptação dos microrganismos ao meio e às condições de operação. O licor misto era removido do reator para ser utilizado como inóculo no teste rápido antes de qualquer troca de meio no dia (aproximadamente 15 h depois da última troca). O TRS, calculado após o término da operação, foi de 10 d.

Foram realizados diversos testes para avaliar o efeito de diferentes congêneres de RL, sendo as etapas apresentadas na Figura 15 e melhor descritas nos itens a seguir. Cada etapa (1, 2 e 3) foi realizada com diferentes RBS para gerar o inóculo necessário para o teste rápido.

Figura 15 – Etapas realizadas para avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres de RL no teste rápido.



Fonte: elaboração própria.

### 7.2.2.1 Determinação da melhor condição do teste rápido (Etapa 1)

As relações  $S_0/X_0$  e produto/biomassa são duas variáveis identificadas como sendo capazes de influenciar os resultados, por isso foi feito um planejamento de experimentos para observação dos efeitos combinados. Na literatura, para este tipo de teste, observa-se valores de  $S_0/X_0$  entre

0,12 e 2 (CHEN, MO E LIU, 2002; CHEN *et al.*, 2006; FANG *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2013; TIAN *et al.*, 2013; YANG, XIE E LIU, 2003). Quando se observou 52% de redução no descarte de lodo (item 5) com biossurfactante produzido em laboratório, a relação produto/biomassa média era de 25 mg RL/g SST. A faixa de estudo escolhida (Tabela 16) engloba, portanto, todos esses valores.

Tabela 16 – Valores reais e codificados das variáveis usadas no planejamento de experimentos.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
$S_0/X_0$ (g DQO/g SST)	0,12	1,06	2,00
$RL/X_0$ (mg RL/g SST)	15	25	35

Fonte: elaboração própria.

Para avaliação do efeito de 2 variáveis, recomenda-se a utilização de um delineamento composto central rotacional (DCCR), com  $\alpha$  1,4142 (RODRIGUES E IEMMA, 2005). Para a faixa de estudo escolhida, o valor de  $S_0/X_0$  em -1,4142 apresenta valor negativo, impossibilitando a realização deste tipo de planejamento. Por isso foi feito o delineamento de face centrada (DFC), com  $\alpha = 1$ . Esta escolha pode inclusive ser considerada melhor, pois garante que todos os resultados obtidos estarão dentro da faixa de estudo escolhida, não havendo região intermediária sem investigação, como ocorre nos casos em que  $\alpha = \sqrt{k}$  (FERREIRA *et al.*, 2007).

As condições do DFC estão descritas na Tabela 17. Cada nível de  $S_0/X_0$  deve possuir um experimento Controle (sem adição de biossurfactante), pois a alteração desta relação por si só já é capaz de alterar o metabolismo microbiano (LIU, 1996). Portanto, cada condição do planejamento foi realizada em paralelo com seu respectivo Controle.

Tabela 17 – Condições experimentais do DFC.

Condição	$S_0/X_0^{(a)}$ (g/g)	$RL/X_0^{(a)}$ (mg/g)	SST <sup>(b)</sup> (mg/L)	DQO <sup>(c)</sup> (mg/L)	RL <sup>(d)</sup> (mg/L)
1	-1 (0,12)	-1 (15)	1000	120	15
2	+1 (2,00)	-1 (15)	1000	2000	15
3	-1 (0,12)	+1 (35)	1000	120	35
4	+1 (2,00)	+1 (35)	1000	2000	35
5	-1 (0,12)	0 (25)	1000	120	25
6	+1 (2,00)	0 (25)	1000	2000	25
7	0 (1,06)	-1 (15)	1000	1060	15
8	0 (1,06)	+1 (35)	1000	1060	35
9	0 (1,06)	0 (25)	1000	1060	25
10	0 (1,06)	0 (25)	1000	1060	25
11	0 (1,06)	0 (25)	1000	1060	25

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Valores codificados. Entre parênteses, valores reais. <sup>(b)</sup>Inóculo oriundo de RBS, com operação descrita no item 7.2.2. <sup>(c)</sup>Meio TSB 30 g/L. <sup>(d)</sup>Produto utilizado: R90 (Tabela 3). Solução estoque contendo 40 g<sub>(massa úmida)</sub> R90/L e 22,5 g RL/L, considerando fator 0,4489 g ramnose/g RL.

As variáveis de resposta utilizadas foram  $Y_{X/S}$ ,  $k$  e  $SOUR_{ex}$ . Para a análise do DFC, considerou-se que todos os Controles apresentaram valores iguais a 1, pois assim a análise dos resultados já mostra aumento ou redução das respostas em decorrência da adição do produto.

### 7.2.2.2 Validação da melhor condição do teste rápido (Etapa 2)

Para validar os resultados obtidos na Etapa 1, selecionou-se 6 condições de  $S_0/X_0$  e  $RL/X_0$  sob diferentes concentrações iniciais de biomassa, 1000 e 2000 mg SST/L. Desta forma, seria possível avaliar também o efeito da concentração de RL no meio. As condições avaliadas encontram-se descritas na Tabela 18.

Tabela 18 – Condições avaliadas na Etapa 2.

Condição	$S_0/X_0^{(a)}$ (g DQO/g SST)	$RL/X_0^{(a)}$ (mg RL/g SST)	SST <sup>(b)</sup> (mg/L)	DQO <sup>(c)</sup> (mg/L)	RL <sup>(d)</sup> (mg/L)
1	-0,745 (0,36)	-1 (15)	1000	360	15
2	-0,745 (0,36)	0 (25)	1000	360	25
3	-0,745 (0,36)	1 (35)	1000	360	35
4	-0,745 (0,36)	-1 (15)	2000	720	30
5	-0,745 (0,36)	0 (25)	2000	720	50
6	-0,745 (0,36)	1 (35)	2000	720	70
7	0 (1,06)	-1 (15)	1000	1060	15
8	0 (1,06)	0 (25)	1000	1060	25
9	0 (1,06)	1 (35)	1000	1060	35
10	0 (1,06)	-1 (15)	2000	2120	30
11	0 (1,06)	0 (25)	2000	2120	50
12	0 (1,06)	1 (35)	2000	2120	70

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Valores codificados. Entre parênteses, valores reais. <sup>(b)</sup>Inóculo oriundo de RBS, com operação descrita no item 7.2.2. <sup>(c)</sup>Meio TSB 30 g/L. <sup>(d)</sup>Produto utilizado: R90 (Tabela 3). Solução estoque contendo 40 g<sub>(massa úmida)</sub> R90/L e 22,5 g RL/L, considerando fator 0,4489 g ramnose/g RL.

### 7.2.2.3 Avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres (Etapa 3)

Para a avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres, foram avaliados os produtos R90, R95M90, e R95D90. Assim como nos itens 7.2.2.1 e 7.2.2.2, a solução estoque de R90 apresentava concentração de 40 g<sub>(massa úmida)</sub>/L, equivalente a 22,5 g RL/L. Para os produtos R95M90 e R95D90, suas respectivas soluções estoque apresentavam concentrações de 4 g<sub>(massa úmida)</sub>/L e, portanto, nos experimentos com adição deste produtos, utilizou-se volume 10x maior que naqueles que utilizavam R90.

Nesta etapa, manteve-se a melhor condição avaliada anteriormente:  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST e  $RL/X_0$  25 mg RL/g SST, com concentração de biomassa inicial igual a 1000 mg SST/L. Como



o volume útil dos reatores foi reduzido para 125 mL, inicialmente, um experimento foi conduzido para verificar se essa redução influenciaria o resultado obtido. Para isso, 2 Controles e 2 Testes (com R90) foram realizados, um par com 600 mL e o outro com 125 mL de volume útil.

Em seguida, foram realizados 3 experimentos em dias diferentes, todos com 125 mL de volume útil. Foram, então, testados os produtos R90, R95M90, e R95D90, sempre com um Controle em paralelo.

### **7.2.3 Estimativa da taxa de consumo de TSB e RL a partir de SOUR**

Partindo do princípio de que o consumo de substrato é proporcional ao consumo de oxigênio (VON SPERLING, 2007a), a taxa de consumo de oxigênio foi avaliada em diferentes condições com o objetivo de verificar se a taxa de degradação do meio TSB era diferente da taxa de degradação do ramnolipídeo. Para isso, foi utilizado licor misto de um RBS em operação para gerar biomassa ativa para o teste rápido (operação descrita no item 7.2.2) como inóculo. O reator se manteve sem receber alimentação por um período de 48 h para minimizar a influência da DQO residual, sendo, portanto, utilizado após o término dos testes rápidos. Para atingir as concentrações desejadas, o lodo foi diluído em solução aquosa de NaCl 0,5 g/L, utilizada para manter a pressão osmótica (LI E YANG, 2007), e volumes apropriados de solução de TSB 30 g/L e R90 40 g<sub>(massa úmida)</sub>/L foram adicionados em frascos de DBO de 300 mL para atingir as concentrações de DQO e RL desejadas. O método analítico encontra-se descrito no Apêndice A.

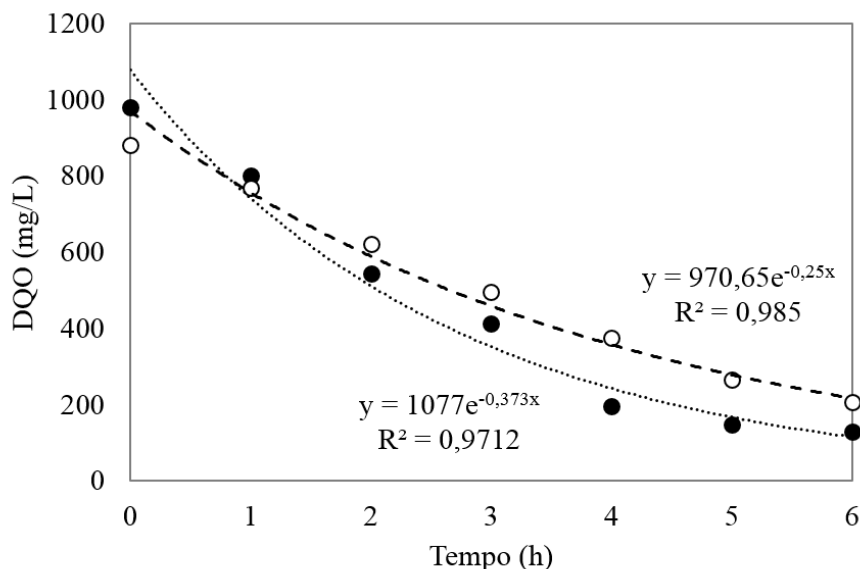
## **7.3 Resultados e discussão**

### **7.3.1 Procedimento 1**

Para escolha do substrato a ser utilizado, dois experimentos Controle foram conduzidos em paralelo, um contendo glicose como única fonte de carbono e outro utilizando o meio TSB. Após as 23 h de ativação da biomassa, observou-se redução de DQO de 93% (TSB) e 98% (glicose). Contudo, nas 4 h de experimento, a cinética de consumo de DQO obtida mostrou que a constante de degradação de substrato ( $k$ ) no meio contendo glicose como única fonte de

carbono foi 33% menor que no meio TSB ( $0,25 \text{ h}^{-1}$  e  $0,373 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente), conforme apresentado na Figura 16. Além disso, visualmente, o lodo que esteve em contato apenas com a glicose apresentou alteração de suas características, com flocos muito finos. Como isso não ocorreu com o meio TSB, considerou-se este meio como o melhor para a condução dos experimentos seguintes.

Figura 16 – Cinética de degradação de substrato após ativação da biomassa por 23 h.



Fonte: elaboração própria. Pontos pretos (●) e linha pontilhada (.....) referem-se ao meio TSB e pontos brancos (○) e linha tracejada (---), meio contendo glicose como única fonte de carbono.

O resultado da varredura de concentrações do dnP encontra-se na Tabela 19. Os resultados obtidos não apresentaram uma tendência, conforme observado no estudo de Chen, Yu e Xi (2006), quando o aumento da concentração de dnP reduziu o coeficiente de rendimento celular. Em concentrações até 5 mg dnP/L (3,1 mg dnP/g SST), observaram redução de aproximadamente 20% em  $Y_{X/S}$ , sem prejuízo na redução de DQO. Neste estudo, contudo, observou-se valores de  $Y_{X/S}$  ligeiramente maiores que no Controle.

Tabela 19 – Varredura de concentrações de dnP em teste rápido.

mg dnP/L (mg dnP/g SST)	$\Delta X$ (mg SST/L)	$\Delta S$ (mg DQO/L)	$Y_{X/S}$
0	$255 \pm 90$	$571 \pm 93$	$0,442 \pm 0,114$
1 (1,2)	390	536	0,728
5 (8,3)	210	380	0,553
10 (14)	240	422	0,569
20 (31)	140	314	0,446

Fonte: elaboração própria.

Pode-se considerar, portanto, que a metodologia não se mostrou adequada. Isso pode ter ocorrido devido a fatores como baixa atividade da biomassa e condição inadequada do teste. Chen, Yu e Xi (2006) utilizaram, como condição inicial, 1600 mg SST/L e DQO 1700 mg/L

(sacarose como única fonte de carbono), enquanto nesta etapa, tinha-se 500 mg SST/L e DQO 1000 mg/L (peptona como principal fonte de carbono). Ou seja, além da fonte de carbono, a relação  $S_0/X_0$  diferente também pode ter influenciado o resultado.

Na literatura, quando este tipo de experimento é utilizado, sempre há um reator em operação cuja única função é gerar biomassa para ser utilizada como inóculo. Como se utilizam TRS baixos, da ordem de 5 d (CHEN, YU E XI, 2006; YANG, XIE E LIU, 2003), pode-se supor que a biomassa é bastante ativa, já que a redução do TRS faz com que somente células jovens e, portanto, mais ativas sejam capazes de se desenvolver. Portanto, a etapa de ativação da biomassa (23 h) pode não ter sido suficiente para ativar os microrganismos ao mesmo nível de um sistema de lodos ativados em funcionamento, contribuindo para não se atingir os resultados esperados.

Apesar dos desacopladores metabólicos serem utilizados como referência em estudos de redução de lodo, as condições de teste normalmente utilizadas podem não ser as melhores quando se está trabalhando com biossurfactantes. Ao avaliar a atividade antimicrobiana de MRL sobre *M. aurum*, Ballot (2009) não observou alteração na zona de crescimento celular ao utilizar um método padrão para avaliação do efeito antimicrobiano de antibióticos. Alterando a metodologia, mas mantendo o mesmo princípio de crescimento em placas, obteve inibição de 2 cm na ZOI. Este resultado mostra que a escolha do teste e de suas condições têm papel fundamental na avaliação do efeito pretendido.

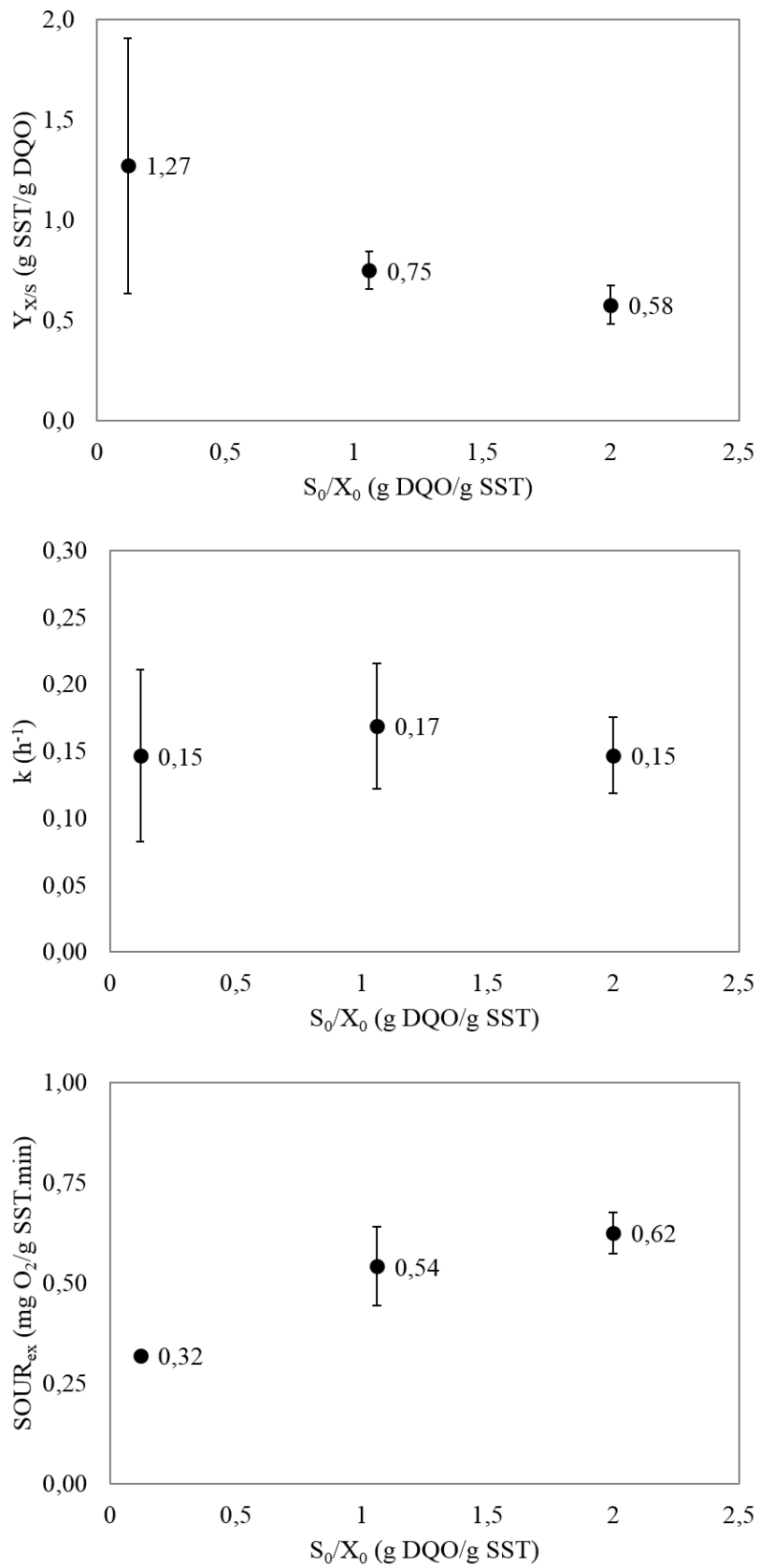
Por todos os motivos apresentados, decidiu-se por seguir o Procedimento 2, avaliando diretamente o efeito do biossurfactante no teste rápido, sob diferentes condições iniciais, utilizando a biomassa ativa com menos diferenças em relação à literatura.

### **7.3.2 Procedimento 2**

#### **7.3.2.1 Determinação da melhor condição do teste rápido (Etapa 1)**

Os resultados obtidos nas condições Controle encontram-se na Figura 17. O aumento de  $S_0/X_0$  acarretou um desacoplamento energético, visualizado pelos menores valores de  $Y_{X/S}$  (LIU, 1996) e maiores valores de  $SOUR_{ex}$ . A taxa de consumo de substrato, contudo, não teve seu valor significativamente alterado com os diferentes valores de  $S_0/X_0$ , já que o inóculo, o substrato e as condições ambientais (pH, temperatura) não se alteraram.

Figura 17 – Avaliação dos Controles avaliados no DFC.



Fonte: elaboração própria.

No valor mais baixo de  $S_0/X_0$  avaliado (0,12 g DQO/g SST), os desvios obtidos foram muito elevados. Isso ocorreu por conta da baixa sensibilidade da análise com baixos valores de DQO. Além disso, a própria condição experimental faz com que a biomassa não cresça tanto quanto nas outras condições avaliadas, contribuindo para o aumento do erro. Ao longo das 4 h de teste, o aumento em SST foi de apenas 7% com 0,12 g DQO/g SST, enquanto que com 2,00 g DQO/g SST, esse aumento foi de 39%.

Os resultados obtidos no DFC encontram-se na Tabela 20. Os valores das variáveis de resposta ( $Y_{X/S}$ ,  $k$  e  $SOUR_{ex}$ ) foram normalizados de modo que cada Controle apresentasse valor igual a 1. Assim, valores maiores que 1 indicam aumento na resposta em decorrência do biossurfactante, enquanto que valores menores que 1, indicam redução. Os valores reais também foram reportados, porém não foram utilizados na análise estatística do planejamento de experimentos.

Tabela 20 – Resultados obtidos no DFC.

$S_0/X_0^{(a)}$	$RL/X_0^{(a)}$	$Y_{X/S}^{(b)}$ (g SST/g DQO)	$k^{(b)}$ ( $h^{-1}$ )	$SOUR_{ex}^{(b)}$ (mg $O_2$ /g SST.min)	$OD^{(c)}$ (mg $O_2$ /L)
-1	-1	0,23 (0,19)	0,93 (0,18)	1,17 (0,37)	6,1 (6,5)
1	-1	1,24 (0,63)	0,92 (0,12)	0,94 (0,62)	4,6 (3,5)
-1	1	0,00 (0,00)	0,77 (0,08)	1,21 (0,40)	3,6 (7,0)
1	1	0,00 (0,00)	0,87 (0,15)	1,78 (1,05)	0,5 (0,4)
-1	0	0,00 (0,00)	0,75 (0,08)	1,01 (0,33)	4,8 (7,0)
1	0	1,31 (0,67)	0,78 (0,10)	1,79 (1,18)	1,3 (3,5)
0	-1	1,25 (1,04)	1,09 (0,14)	1,04 (0,46)	1,2 (1,1)
0	1	0,75 (0,63)	1,28 (0,17)	0,90 (0,40)	1,7 (1,1)
0	0	0,34 (0,22)	0,91 (0,14)	0,87 (0,56)	5,0 (4,7)
0	0	0,51 (0,33)	0,86 (0,13)	0,87 (0,56)	4,5 (4,7)
0	0	0,69 (0,53)	0,90 (0,20)	1,07 (0,57)	2,9 (3,6)

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Valores codificados. <sup>(b)</sup>Valores reportados consideram seus respectivos Controles como sendo 1; valores reais entre parênteses. <sup>(c)</sup>Medida realizada após 30 h de reação. Entre parênteses, valor do respectivo Controle.

Como o ajuste da aeração nos experimentos foi realizado de forma visual para manter a espuma dentro dos reatores, os valores de OD variaram bastante. Após 30 h de reação, observou-se valores que variaram de 0,5 a 6,1 mg/L nos Testes, porém os valores foram sempre próximos dos seus respectivos Controles. Como esperado, menores valores de OD foram observados nas condições com maior  $S_0/X_0$ , por receberem maior concentração de matéria orgânica para degradação.

Os resultados mostram que o crescimento microbiano variou bastante, independente da concentração de RL utilizada; em alguns casos, reduziu até 100% ( $Y_{X/S}=0$ ), enquanto em outros, aumentou até 31% ( $Y_{X/S}=1,31$ ). Por exemplo, a menor concentração de RL utilizada (15 mg

RL/g SST) reduziu  $Y_{X/S}$  em 77% quando  $S_0/X_0$  apresentou o menor valor (0,12 g DQO/g SST), e aumentou em 24% quando  $S_0/X_0$  apresentou o maior valor (2,00 g DQO/g SST).

A análise de variância (ANOVA, Tabela 21) mostrou que o erro puro dos modelos apresentou valores muito reduzidos (em torno de 2%), não indicando problemas de repetibilidade (MANSON, GUNST E HESS, 2003). Para todas as respostas avaliadas, o ajuste do modelo explica 75-78% dos resultados obtidos, e as diferenças entre os valores preditos e experimentais podem ser explicadas pelo erro na propagação das análises, principalmente para  $Y_{X/S}$ . Na tentativa de atender simultaneamente aos requisitos de falta de ajuste e regressão, as variáveis não significativas foram retiradas do modelo. Entretanto, isso fez com que os valores de  $R^2$  reduzissem consideravelmente. Portanto, o modelo completo foi mantido, e os coeficientes e seus respectivos p-valores encontram-se na Tabela 22.

Apesar de os modelos não apresentarem um ajuste perfeito, pode-se utilizar os resultados para uma análise qualitativa, de modo a determinar faixas de interesse, que podem ser visualizadas nas superfícies de resposta apresentadas na Figura 18.

Tabela 21 – ANOVA do DFC.

	SQ*	p-valor	SQ	p-valor	SQ	p-valor
	Resposta: $Y_{X/S}$		Resposta: k		Resposta: $SOUR_{ex}$	
Regressão	2,0	0,13126	0,2	0,09882	0,8	0,12725
Resíduos	0,7	—	0,1	—	0,3	—
Falta de ajuste	0,6	0,13316	0,1	0,03959	0,3	0,14005
Erro puro	0,1	—	0,0	—	0,0	—
Total	2,7	—	0,2	—	1,1	—
$R^2$	74,58%		77,66%		74,94%	

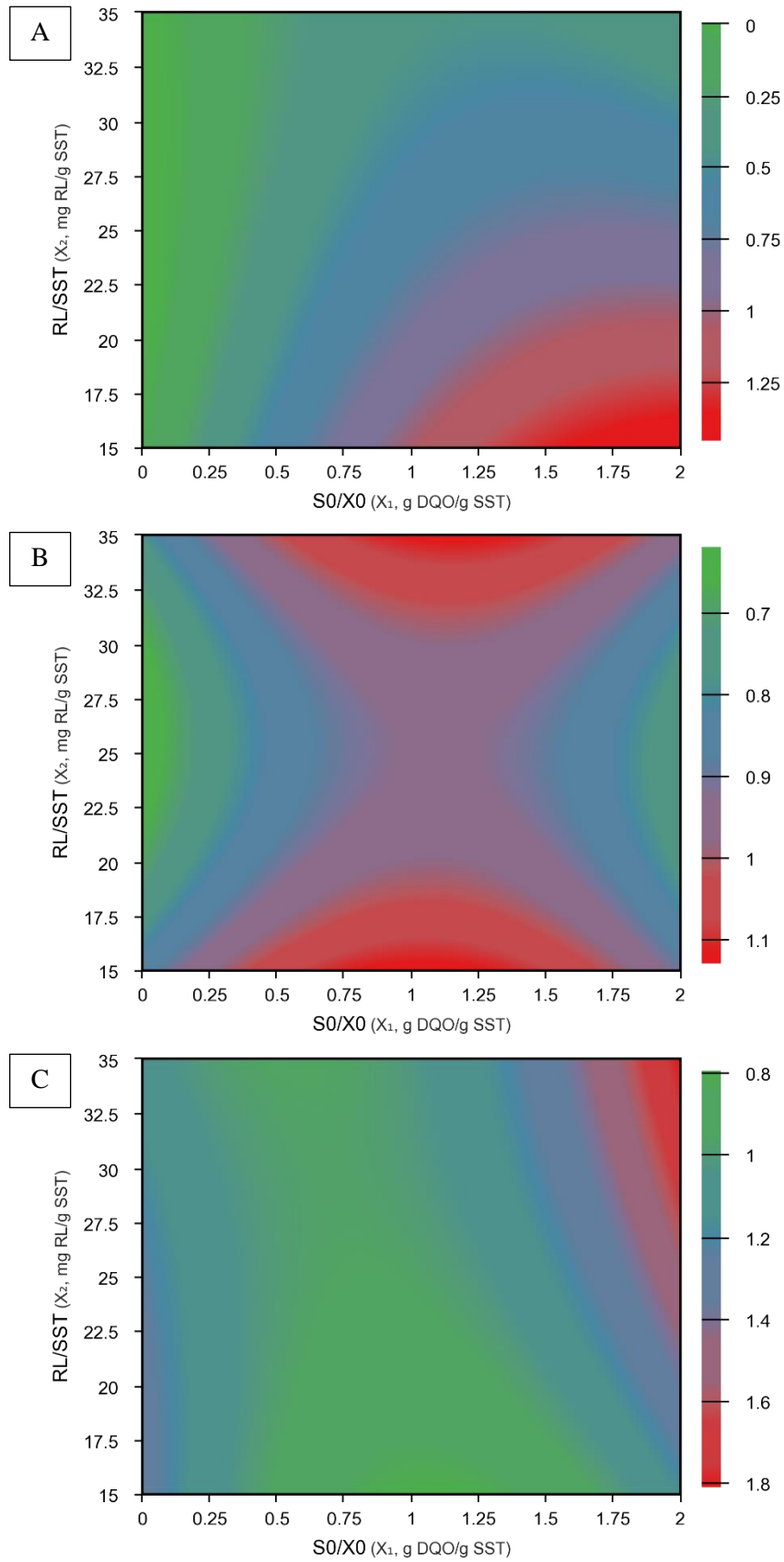
Fonte: elaboração própria. \*SQ: soma de quadrados.

Tabela 22 – Análise de regressão do DFC.

	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor	Coef.	p-valor
	Resposta: $Y_{X/S}$		Resposta: k		Resposta: $SOUR_{ex}$	
Média	0,68*	0,0157*	0,93*	0,0000*	0,97*	0,0005*
$S_0/X_0$ (L)	0,39*	0,0495*	0,02	0,6533	0,19	0,1105
$S_0/X_0$ (Q)	-0,27	0,3014	-0,22*	0,0179*	0,38*	0,0505*
RL/ $X_0$ (L)	-0,33*	0,0801*	0,00	0,9397	0,12	0,2568
RL/ $X_0$ (Q)	0,08	0,7453	0,20*	0,0286*	-0,05	0,7497
$S_0/X_0$ vs. RL/ $X_0$	-0,25	0,2275	0,03	0,6151	0,20	0,1510

Fonte: elaboração própria. (L): Linear. (Q): Quadrático. \*Valores estatisticamente significativos no modelo (90% de confiança).

Figura 18 – Superfícies de resposta do DFC.



Fonte: software Protimiza. Os valores das respostas estão relacionados a seus respectivos Controles (resultados de Controle = 1). Os eixos x e y de cada gráfico representam valores reais de cada variável avaliada. (A)  $Y_{X/S}$ . (B)  $k$ . (C)  $SOUR_{ex}$ .

A superfície referente a  $Y_{X/S}$  (Figura 18A) mostra que o efeito do biossurfactante no crescimento microbiano depende da condição inicial do teste: quanto maior o valor de  $S_0/X_0$ , maior a concentração de RL necessária para se atingir um determinado percentual de redução. Isso ocorre devido ao desacoplamento energético em elevados valores de  $S_0/X_0$ , que acarreta menores valores de  $Y_{X/S}$ , mesmo quando nenhum produto é adicionado (CHUDOBA *et al.*, 1991; LIU, 1996; LIU, CHEN E PAUL, 1998). Como o valor de referência, ou seja, o valor do Controle, é mais baixo quando  $S_0/X_0$  é elevado (Figura 17), mais produto deve ser adicionado para manter o mesmo percentual de redução. Este resultado é de extrema importância, pois biossurfactantes são produtos que ainda apresentam custo muito elevado de produção (HENKEL *ET AL.*, 2012; VARJANI E UPASANI, 2017), o que pode tornar seu uso inviável em aplicações menos nobres, como em ETE e ETDI. Em uma situação em que há deficiência de substrato, baixas concentrações de RL seriam suficientes para reduzir significativamente o crescimento, garantindo custo reduzido de aplicação. Em plantas que utilizam RBS, basta manter  $S_0/X_0$  em valores reduzidos. Em sistemas contínuos de mistura completa, considerando que o afluente é completa e instantaneamente misturado com todo o conteúdo do reator, e que geralmente toda a matéria orgânica biodegradável é completamente consumida no reator biológico (HENZE *et al.*, 2008), não se espera excesso de substrato no reator, mantendo-se baixa relação  $S_0/X_0$ .

A redução de lodo decorrente da adição de (bios-)surfactantes em sistemas de lodos ativados ainda não teve o mecanismo de ação elucidado. Uma das possibilidades é o efeito antimicrobiano em decorrência da interação do produto com a fração lipídica das membranas celulares, que pode afetar sua integridade e/ou permeabilidade (BALLOT, 2009; SEN, 2010), inibindo o crescimento de algumas espécies do consórcio de lodos ativados. Entretanto, nas condições deste teste rápido, isso não seria capaz de explicar os resultados obtidos, pois a população microbiana era oriunda da mesma fonte e, provavelmente mantinha a mesma composição em todas as condições avaliadas.

Outra possibilidade é que, nas concentrações avaliadas, o RL teria atuado apenas como substrato adicional no meio, pois sua taxa de consumo deve ser menor que a dos constituintes do meio TSB. Portanto, quando ocorria deficiência de substrato ( $S_0/X_0$  baixo), as células utilizariam o RL para obter a energia necessária para o metabolismo ao longo do tempo de teste. Se a taxa de consumo é menor, as células não obtêm energia imediata, o que poderia justificar a ausência de crescimento significativo no período de 4 h. A superfície de resposta para k



(Figura 18B) mostra que quando  $S_0/X_0$  é baixo,  $k$  pode atingir valores até 30% menores que o Controle.

Partindo do princípio de que o consumo de substrato é proporcional ao consumo de oxigênio (VON SPERLING, 2007a), a taxa de consumo de oxigênio foi avaliada em diferentes condições (item 7.2.3) para verificar se o meio TSB e o RL são consumidos com velocidades diferentes. Os resultados são apresentados na Tabela 23. Com 107 mg SST/L, a taxa de consumo de oxigênio decorrente do consumo de RL é 64% mais baixa que a do TSB, mantendo-se a mesma DQO inicial e concentração de RL dentro da faixa de estudo do DFC. Com 1074 mg SST/L, a redução é de 90%, em decorrência das diferentes concentrações de matéria orgânica no meio. Contudo, quando se compara o consumo de oxigênio decorrente somente do TSB com o consumo decorrente da mistura de TSB com RL (25 mg RL/L), a redução é de 14%. Este valor é condizente com as reduções em  $k$  obtidas no DFC e, portanto, pode-se afirmar que a taxa de consumo de RL é menor que a taxa de consumo do meio TSB.

Tabela 23 – Estimativa da taxa de consumo de TSB e RL a partir da SOUR.

Condição	SST (mg/L)	DQO-TSB (mg/L)	DQO-RL (mg/L)	RL (mg RL/L)	SOUR (mg O <sub>2</sub> /g SST.min)
1 Lodo + TSB	107	103	0	0	0,73
2 Lodo + RL	107	0	100	27	0,26
3 Lodo + TSB	1074	1111	0	0	0,93
4 Lodo + RL	1074	0	92	25	0,084
5 Lodo + TSB + RL	1074	1111	92	25	0,80

Fonte: elaboração própria.

As condições de baixo  $S_0/X_0$  (0,12 g DQO/g SST), que acarretaram 100% de redução do crescimento, não são de interesse, pois resultariam na perda total de biomassa no reator de lodos ativados, já que não haveria renovação celular. Conforme pode ser observado na Figura 18 (A e B), quando  $S_0/X_0$  aumenta até o ponto central, a redução do crescimento ainda é significativa (25-75%) e os valores de  $k$  do Teste não são tão diferentes do Controle (entre 15% menor e 10% maior, conforme Tabela 20). Considerando o erro das análises, a redução de  $k$  é muito baixa para representar um problema. Desse modo, idealmente  $S_0/X_0$  não pode ser muito baixo e deve se restringir a um valor máximo de 1,06 g DQO/g SST (o valor do ponto central).

A  $SOUR_{ex}$  foi quantificada para auxiliar na determinação do mecanismo de ação do RL. Os dados mostram que apenas o termo quadrático de  $S_0/X_0$  é significativo no modelo (Tabela 22). Estima-se que, na maioria dos casos, o RL teria sido completamente consumido após 30 h de reação, já que não havia mais formação intensa de espuma na maior parte das condições. Logo, o produto não exercia mais grande influência no processo. Dependendo da região,  $SOUR_{ex}$  do Teste foi 20% mais baixa e 80% mais elevada que o Controle (Figura 18C). Em geral,  $SOUR_{ex}$

do Teste foi maior que do Controle quando redução significativa do crescimento foi observada. Quando há desacoplamento energético no metabolismo celular, a taxa de consumo de oxigênio aumenta sem qualquer associação com o crescimento (CHEN, MO E LIU, 2002; MAYHEW E STEPHENSON, 1998). Além disso, ácidos graxos (principalmente de cadeia longa) podem agir como desacopladores metabólicos quando as células microbianas são submetidas a determinadas condições fisiológicas, e parte disso é decorrente da interação com as membranas celulares (PAOLA, DI E LORUSSO, 2006; WIECKOWSKI E WOJTCZAK, 1998; WOJTCZAK E SCHÖNFELD, 1993). Portanto, com base nos resultados de  $SOUR_{ex}$  e ao fato de RL também ser capaz de interagir com as membranas celulares (BALLOT, 2009; SEN, 2010), pode-se levantar a hipótese de que o RL pode agir como desacoplador metabólico em sistemas de lodos ativados.

O aumento do consumo de oxigênio pode ser considerado uma desvantagem do processo, pois representa custo adicional com aeração. Mais estudos precisam ser realizados para avaliar se o aumento no requisito de oxigênio compensa a redução de lodo atingida, tendo em mente todos os pilares envolvidos: econômico, ambiental, social e político (POULSEN E HANSEN, 2003), e não apenas o econômico.

### 7.3.2.2 Validação da melhor condição do teste rápido (Etapa 2)

As condições Teste avaliadas nesta etapa não possuíam réplicas, mas pode-se estimar erros percentuais semelhantes aos Controles. Para cada relação RL/ $X_0$  diferente, foi realizada uma condição Controle, ou seja, para cada  $S_0/X_0$  foram feitos três Controles, cujos resultados encontram-se na Tabela 24. Como as respostas apresentam valores muito baixos, o coeficiente de variação acaba adquirindo valores elevados. Considerando os erros das análises, os desvios obtidos são aceitáveis. A única exceção foi  $S_0/X_0$  0,36 g DQO/g SST com 1000 mg SST/L, onde o desvio de Y foi muito elevado ( $0,74 \pm 0,40$  g SST/g DQO) em decorrência de algum efeito não determinado em uma das réplicas.

Tabela 24 – Resultado dos Controles na Etapa 2.

$S_0/X_0^{(a)}$ (g DQO/g SST)	SST inicial (mg/L)	$Y_{X/S}^{(b)}$ (g SST/g DQO)	$k^{(b)}$ ( $h^{-1}$ )	$SOUR_{ex}^{(b)}$ (mg $O_2$ /g SST.min)
-0,745 (0,36)	1000	$0,74 \pm 0,40$	$0,52 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,07$
-0,745 (0,36)	2000	$0,69 \pm 0,22$	$0,48 \pm 0,05$	$0,44 \pm 0,10$
0 (1,06)	1000	$0,52 \pm 0,04$	$0,18 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,10$
0 (1,06)	2000	$0,61 \pm 0,14$	$0,13 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,04$

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Valores codificados. Entre parênteses, valores reais. <sup>(b)</sup>Valores reais, sem qualquer transformação, e representados como média  $\pm$  desvio padrão.

Apesar das diferenças nas condições iniciais dos experimentos, como se utiliza essencialmente os mesmos inóculo, substrato e temperatura, espera-se que o valor de  $k$  não apresente grandes variações, o que não ocorreu. As condições com  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST foram avaliadas na 2ª e 3ª semanas de operação do reator que gerava o inóculo para os experimentos, e o valor de  $k$  médio foi  $0,16 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$ , igual ao valor dos Controles obtido no DFC ( $0,16 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ ). Na 4ª e última semana de operação, quando foram realizados os experimentos com  $S_0/X_0$  0,36 g DQO/g SST, este valor aumentou para  $0,50 \pm 0,04 \text{ h}^{-1}$ . Não foram identificadas causas que justificassem esses resultados, além de adaptação da população microbiana ao meio TSB. Porém, esse efeito não foi observado na Etapa 1, quando os Controles apresentaram  $k$  médio de  $0,19 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$  na 4ª e última semana de operação do reator que gerava o inóculo.

Considerando apenas as condições com  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST, não se observou problemas de reprodutibilidade com os Controles em relação a  $k$  e  $SOUR_{ex}$ : as médias obtidas são estatisticamente iguais àquelas obtidas na Etapa 1 (teste t, 90% de confiança). Apenas os valores de  $Y_{X/S}$  apresentaram diferenças significativas  $0,75 \pm 0,09$  (Figura 17),  $0,52 \pm 0,04$  (Tabela 24, 1,06 g DQO/g SST, 1000 mg SST/L), e  $0,61 \pm 0,14$  g SST/g DQO (Tabela 24, 1,06 g DQO/g SST, 2000 mg SST/L). Isso ocorreu devido à maior propagação do erro na determinação de  $Y_{X/S}$ ; entretanto, as diferenças são aceitáveis e não comprometem a análise.

Os resultados obtidos nas condições Teste encontram-se na Tabela 25. Como os modelos gerados só são capazes de explicar 75-78% dos resultados (Tabela 21), é de se esperar algumas discrepâncias entre os valores preditos e aqueles obtidos experimentalmente nesta etapa. Na Figura 19 é possível observar a dispersão dos pontos em relação à condição ideal (valor predito = valor experimental). Entretanto, essa dispersão é maior quando a condição inicial do teste rápido é 2000 mg SST/L.

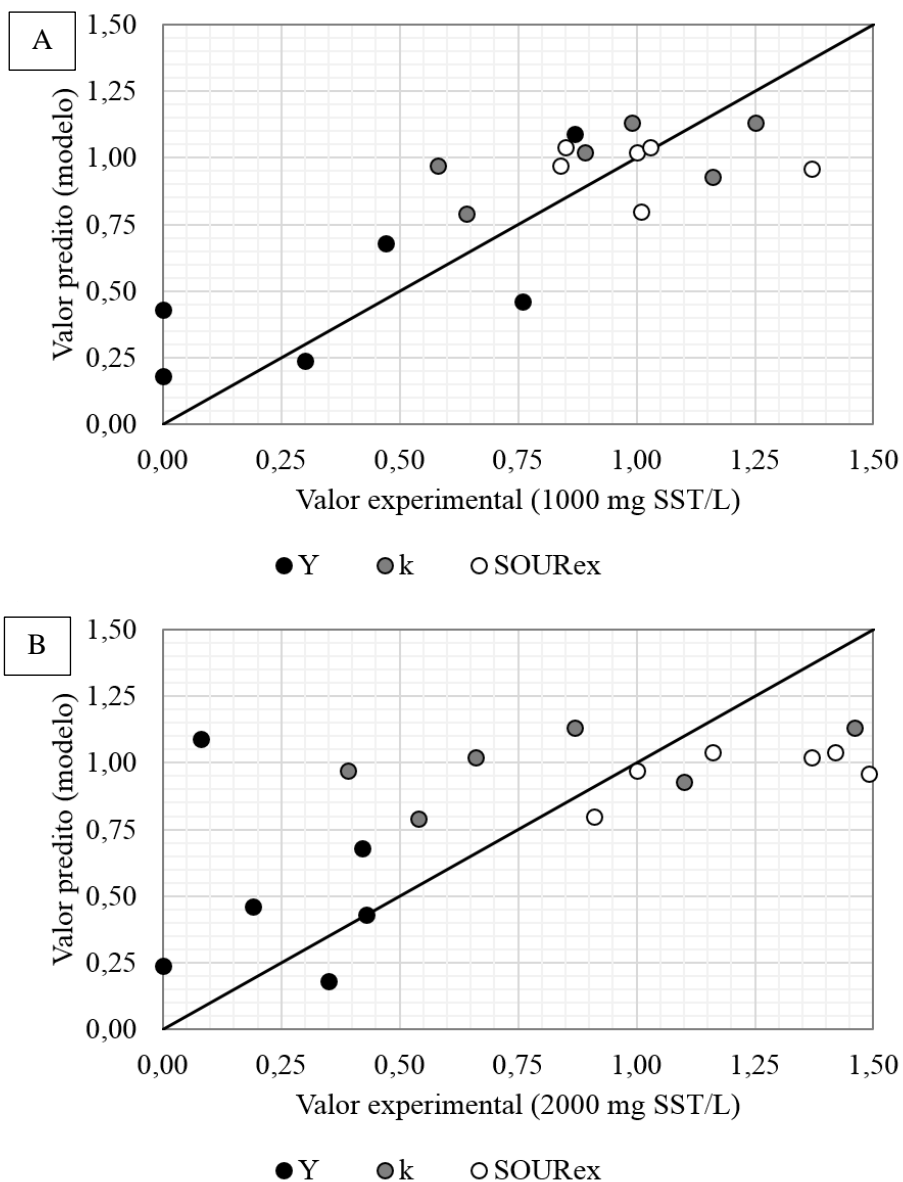
Considerando apenas a condição inicial de 1000 mg SST/L e todas as respostas avaliadas ( $Y_{X/S}$ ,  $k$  e  $SOUR_{ex}$ ), erros entre 11 e 31% são obtidos com  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST, podendo chegar a 65% quando se considera também os dados referentes a  $S_0/X_0$  0,36 g DQO/g SST. Porém, os experimentos conduzidos nesta última condição apresentaram variações que não foram observadas na Etapa 1, conforme mencionado anteriormente, e isso refletiu no erro obtido. Considerando, então, apenas  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST, pode-se afirmar que os erros obtidos estão dentro do esperado.

Tabela 25 – Resultados obtidos na validação do modelo gerado no DFC.

$S_0/X_0$ <sup>(a)</sup>	$RL/X_0$ <sup>(b)</sup>	DFC <sup>(c,d)</sup>	Modelo <sup>(c,e)</sup>	Validação <sup>(c,f)</sup> 1000	Validação <sup>(c,g)</sup> 2000
Resposta: $Y_{X/S}$					
-0,745	-1	n.a.	0,46	0,76 (0,92)	0,19 (0,18)
-0,745	0	n.a.	0,24	0,30 (0,17)	0,00 (0,00)
-0,745	1	n.a.	0,18	0,00 (0,00)	0,35 (0,23)
0	-1	1,25	1,09	0,87 (0,47)	0,08 (0,05)
0	0	0,52±0,17	0,68	0,47 (0,23)	0,42 (0,32)
0	1	0,75	0,43	0,00 (0,00)	0,43 (0,22)
Resposta: k					
-0,745	-1	n.a.	1,02	0,89 (0,45)	0,66 (0,35)
-0,745	0	n.a.	0,79	0,64 (0,34)	0,54 (0,27)
-0,745	1	n.a.	0,97	0,58 (0,31)	0,39 (0,17)
0	-1	1,09	1,13	0,99 (0,26)	1,46 (0,18)
0	0	0,89±0,02	0,93	1,16 (0,21)	1,10 (0,17)
0	1	1,28	1,13	1,25 (0,13)	0,87 (0,10)
Resposta: $SOUR_{ex}$					
-0,745	-1	n.a.	1,02	1,00 (0,48)	1,37 (0,46)
-0,745	0	n.a.	1,04	1,03 (0,60)	1,42 (0,63)
-0,745	1	n.a.	0,96	1,37 (0,84)	1,49 (0,79)
0	-1	1,04	0,80	1,01 (0,48)	0,91 (0,50)
0	0	0,94±0,11	0,97	0,84 (0,49)	1,00 (0,48)
0	1	0,90	1,04	0,85 (0,58)	1,16 (0,65)

Fonte: elaboração própria. n.a.: não avaliado. <sup>(a)</sup>Valores codificados. <sup>(b)</sup>Valores codificados. Para  $RL/X_0$  -1, 0 and +1, concentrações de RL equivalem a, em mg RL/L: 15, 25, and 35 (1000 mg TSS/L) e 30, 50, and 70 (2000 mg TSS/L), respectivamente. <sup>(c)</sup>Valores reportados consideram seus respectivos Controles como sendo 1; valores reais entre parênteses ( $Y_{X/S}$  em g SST/g DQO; k em  $h^{-1}$ ;  $SOUR_{ex}$  em mg  $O_2$ /g SST.min). <sup>(d)</sup>Valores obtidos previamente (Tabela 20). <sup>(e)</sup>Valores calculados com os coeficientes do modelo reportados na Tabela 22. <sup>(f)</sup>Valores obtidos nesta etapa do estudo com SST inicial 1000 mg/L. <sup>(g)</sup>Valores obtidos nesta etapa do estudo com SST inicial 2000 mg/L.

Figura 19 – Avaliação de discrepâncias obtidas nos resultados da Etapa 2.



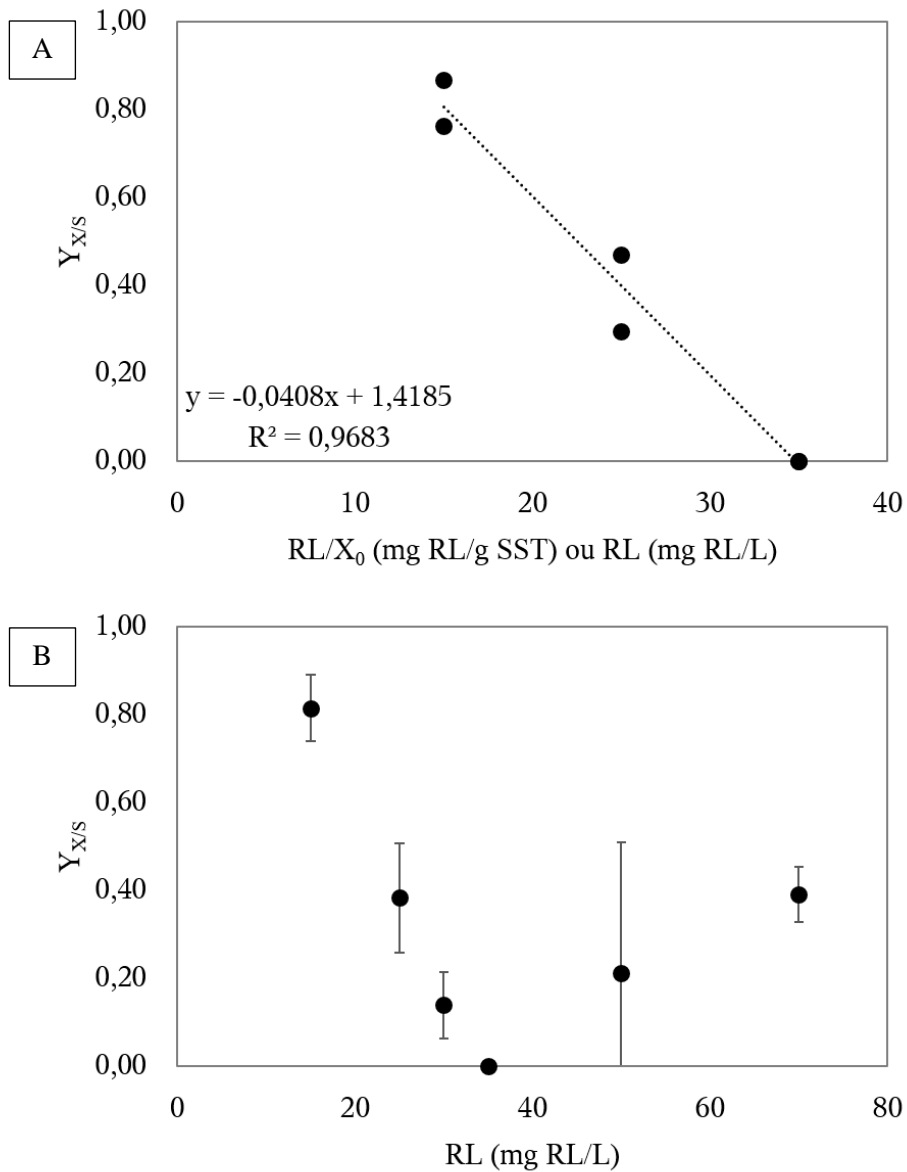
Fonte: elaboração própria. Pontos cheios pretos (●) representam dados referentes aos valores de  $Y_{X/S}$ , pontos cheios cinzas (●), dados referentes aos valores de  $k$ , e pontos vazados (○), dados referentes aos valores de  $SOUR_{ex}$ . Todos os valores reportados estão em função de seus respectivos Controles (valores do Controle = 1). Dados referentes a  $X_0$  igual a (A) 1000 mg SST/L e (B) 2000 mg SST/L.

Quando a concentração inicial de SST dobrou (2000 mg SST/L), a concentração de RL no meio também dobrou, de modo a manter a relação produto/biomassa fixa em seus valores originais. Mesmo mantendo valores abaixo da CMC (154 mg RL/L, conforme Tabela 3), as concentrações utilizadas ultrapassaram a faixa de estudo do DFC (Etapa 1, item 7.3.2.1). Como os erros obtidos chegaram a até 94% nessas condições, pode-se afirmar que a concentração de RL no meio é tão importante quanto a relação  $RL/X_0$ .

Considerando apenas os dados gerados nos experimentos com  $X_0$  1000 mg SST/L, obtém-se uma correlação direta ( $R^2$  0,9683) entre a redução do crescimento microbiano e o aumento, tanto da relação  $RL/X_0$ , quanto da concentração de RL, conforme observado na Figura 20A. Contudo, quando se avalia todos os dados reportados na Tabela 25, independente da concentração inicial de biomassa, percebe-se que a redução do crescimento obtida é dependente da concentração de RL utilizada (Figura 20B). O produto reduz significativamente o crescimento em concentrações de até 35 mg RL/L. Acima disso, o efeito se mostra atenuado.

Em concentrações abaixo da CMC, surfactantes são capazes de interagir com as membranas celulares, logo, são os monômeros, e não as micelas, os responsáveis por este efeito (XIA E ONYUKSEL, 2000). Porém, as interações entre as moléculas de surfactantes não ocorrem apenas na CMC; em concentrações mais baixas, vesículas e micelas já são observadas, enquanto que acima da CMC, apenas as micelas estão presentes (LICHTENBERG, 1985). Pequenos agregados, como vesículas, já foram observados com ramnolipídeos (İKIZLER *et al.*, 2017; SÁNCHEZ *et al.*, 2007). Nas condições desta etapa, a adição de 50 mg RL/L já deve ser capaz de formar agregados, o que diminuiria a quantidade de monômeros e, conseqüentemente, seu efeito antimicrobiano.

Figura 20 – Efeito da concentração de RL na redução do crescimento.



Fonte: elaboração própria. Valores de  $Y_{X/S}$  reportados em função dos seus respectivos Controles (valor do Controle = 1). (A) Resultados das condições com concentração inicial de biomassa igual a 1000 mg SST/L. (B) Todos os resultados (concentração inicial de biomassa igual a 1000 e 2000 mg SST/L).

### 7.3.2.3 Avaliação do efeito de diferentes proporções de congêneres (Etapa 3)

Para avaliar se a redução do volume iria influenciar o resultado, o produto R90 foi utilizado em um experimento conduzido simultaneamente com 600 mL e 125 mL de volume útil, cujos resultados encontram-se na Tabela 26. Como os valores obtidos foram muito próximos e dentro da variação observada anteriormente, deu-se continuidade aos testes.

Tabela 26 – Avaliação da redução do volume útil no teste rápido.

Volume útil (mL)	$Y_{X/S}^{(a)}$ (g SST/g DQO)	$SOUR_{ex}^{(a)}$ (mg O <sub>2</sub> /g SST.min)
600	0,54 (0,42)	0,97 (0,57)
125	0,64 (0,31)	1,14 (0,48)

Fonte: elaboração própria. Todos os testes conduzidos com 1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/g SST (R90) e X<sub>0</sub> 1000 mg SST/L. <sup>(a)</sup>Valores reportados consideram seus respectivos Controles como sendo 1; valores reais entre parênteses.

A Tabela 27 mostra o efeito das diferentes proporções de congêneres no metabolismo microbiano. Os valores representam os resultados de 3 testes conduzidos em dias diferentes, para que se pudesse avaliar estatisticamente os resultados. A variação observada foi maior nos experimentos conduzidos com adição de R95M90 e R95D90. Considerando os valores reportados em função de seus respectivos Controles, o coeficiente de variação para R90 foi de apenas 2,5 e 3,1% para  $Y_{X/S}$  e  $SOUR_{ex}$ , respectivamente. Para os congêneres, esses valores chegaram a 29 e 17%.

Tabela 27 – Efeito de diferentes congêneres de RL no crescimento microbiano (Etapa 3).

Produto	MRL:DRL <sup>(a)</sup>	$Y_{X/S}^{(b)}$ (g SST/g DQO)	$SOUR_{ex}^{(b)}$ (mg O <sub>2</sub> /g SST.min)
R90	≈ 3:2	0,82 ± 0,02 (0,56 ± 0,06)	1,00 ± 0,03 (0,82 ± 0,22)
R95M90	9:1	0,99 ± 0,28 (0,67 ± 0,13)	0,94 ± 0,14 (0,74 ± 0,10)
R95D90	1:9	0,94 ± 0,27 (0,63 ± 0,13)	0,81 ± 0,14 (0,64 ± 0,076)

Fonte: elaboração própria. Todos os testes conduzidos com 1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/g SST e X<sub>0</sub> 1000 mg SST/L. <sup>(a)</sup>Tabela 3. <sup>(b)</sup>Média ± desvio padrão. Valores reportados consideram seus respectivos Controles como sendo 1; valores reais entre parênteses.

A análise de variância e o teste de Tukey não apontaram diferença significativa entre os 3 produtos avaliados, por isso a Hipótese 4 não pôde ser confirmada. Uma das possibilidades para não observação do efeito seria a concentração de ramnolipídeos. Conforme observado na Etapa 2, a redução do crescimento é diretamente proporcional à concentração até um determinado momento, quando então o efeito é atenuado. A quantificação de ramnose nos produtos R95M90 e R95D90 não pôde ser efetuada, portanto, não se pode afirmar que a concentração de ramnolipídeos no meio reacional foi igual em todos os casos, podendo ter contribuído para a discrepância dos resultados.

Quando se analisa somente o resultado de R90, observa-se que a redução do crescimento obtida nesta etapa foi menor que em todas as anteriores, considerando a mesma condição do experimento (1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/g SST e 1000 mg SST/L). Os valores de  $Y_{X/S}$  em função de seus respectivos Controles, foram 0,52±0,17, 0,47, 0,59±0,07, e 0,82±0,02 nas Etapas 1, 2, 3-Tabela 26, e 3-Tabela 27, respectivamente. Ou seja, os resultados estavam se mostrando próximos até esta etapa.



Conforme já comentado anteriormente, a variação no substrato, no produto (grau de pureza, proporção de congêneres) e no inóculo são capazes de influenciar os resultados obtidos. Nesta fase do estudo, eliminou-se a influência do substrato e do produto. O lodo de ETE utilizado na partida dos RBS que operaram para gerar inóculo para o teste rápido foi o mesmo, oriundo de uma única coleta. Porém, para realização das Etapas 1, 2 e 3, diferentes RBS foram utilizados. Apesar do mesmo procedimento e de não se ter observado problemas nas operações, algum fator não identificado pode ter modificado o estado fisiológico das células, comprometendo os resultados nesta última etapa.

#### **7.4 Conclusões**

O planejamento de experimentos mostrou que  $S_0/X_0$  e  $RL/X_0$  influenciam as respostas avaliadas ( $Y_{X/S}$ ,  $k$  e  $SOUR_{ex}$ ), sendo possível observar as faixas de interesse para a aplicação desejada. Quanto menor o valor de  $S_0/X_0$ , maior a redução do crescimento obtida e menores concentrações de RL se fazem necessárias. Valores muito baixos de  $S_0/X_0$  (0,12 g DQO/g SST) não permitiram crescimento microbiano em nenhuma concentração de RL avaliada (15 a 35 mg RL/g SST e 15 a 35 mg RL/L) e reduziram a taxa de consumo de substrato, não sendo uma condição de interesse em sistemas reais de tratamento. A região que levou aos melhores resultados foi aquela próxima ao ponto central (1,06 g DQO/g SST e 25 mg RL/g SST), garantindo 25-75% de redução no crescimento, taxa de consumo de substrato próxima ao Controle e taxa específica de consumo de oxigênio ligeiramente maior. Com base nos resultados, pode-se levantar a hipótese de que o RL pode atuar como desacoplador metabólico sob determinadas condições.

A avaliação da mesma relação  $RL/X_0$ , sob diferentes concentrações iniciais de biomassa e, conseqüentemente, de ramnolipídeo, mostraram que a concentração de RL por si só é capaz de afetar os resultados. Mesmo em concentrações menores que a CMC, o efeito na redução do crescimento pode ser atenuado em decorrência da formação de agregados, reduzindo os monômeros livres para interação com as membranas biológicas.

Os resultados não mostraram diferenças no crescimento microbiano em decorrência da adição de diferentes misturas de congêneres, por isso a Hipótese 3 (Quadro 1) não pôde ser confirmada.



## **8 Efeito combinado entre adição de biossurfactante do tipo ramnolípídeo e TRS de sistemas de lodos ativados**

### **8.1 Introdução**

O efeito de produtos avaliados em testes de atividade antimicrobiana é altamente dependente das células utilizadas como referência. Haba *et al.* (2003) avaliaram a CMI de ramnolípídeos utilizando diferentes microrganismos, além dos já apresentados na Tabela 15, observando valores que variaram de 0,5 (*Klebsiella pneumoniae*) a mais de 256 mg/L (*Proteus mirabilis*). Este resultado demonstra a importância da espécie microbiana empregada na avaliação do efeito do biossurfactante, pois todos os resultados foram obtidos com a mesma mistura de ramnolípídeos e seguindo a mesma metodologia.

Em sistemas de lodos ativados, a composição de espécies no reator é alterada de acordo com a natureza do efluente e as condições de operação: à medida que se modifica o ambiente, também se modifica os microrganismos predominantes neste ambiente (PAUL E LIU, 2012). E, conforme já mencionado, o efeito a longo prazo de um produto pode ser diferente do efeito a curto prazo, pois as células podem se adaptar às substâncias adicionadas (FOLADORI, ANDREOTTOLA E ZIGLIO, 2010; GUO *et al.*, 2013).

Somado a isso, trocas sucessivas de meio podem alterar o equilíbrio do sistema, alterando a condição inicial. Deste modo, a melhor condição obtida no teste rápido apresentado no item 7 pode não ser a melhor quando se fazem trocas sucessivas de meio devido ao efeito sinérgico com outras variáveis que passam a ter importância significativa neste tipo de operação, como TRH e TRS.

Portanto, o objetivo desta etapa é avaliar o efeito do TRS em reatores operando em bateladas sequenciais na mesma condição apontada no teste rápido como ideal para obtenção dos resultados ( $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/g SST  $\equiv$  25 mg RL/L).

### **8.2 Procedimento experimental**

A operação dos RBS seguiu o procedimento descrito anteriormente (itens 5 e 6), porém com volume útil de 600 mL, mantendo-se as respectivas proporções. Como a melhor condição apontada no teste rápido (item 7) foi  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST,  $RL/X_0$  25 mg RL/g SST e

concentração inicial de biomassa igual a 1000 mg SST/L, a partida dos reatores se deu com volume apropriado de lodo oriundo de ETE para se atingir 1000 mg SST/L. A alimentação consistia de meio TSB (DQO 1060 mg/L) e  $\text{NaHCO}_3$  (0,9 g/L), de modo a manter o pH em torno de 7 no reator. Os reatores operaram a 19-28°C e a vazão de ar foi controlada manualmente, de modo a manter OD de pelo menos 1 mg/L. O produto avaliado foi o R90, com solução estoque contendo 40 g<sub>(massa úmida)</sub> produto/L, equivalente a 22,5 g RL/L (considerando fator 0,4489 g ramnose/g RL). Nesta etapa, 4 reatores operaram em paralelo: 2 Controles (sem adição de RL) e 2 Testes (com adição de RL), ambos com TRS 10 d e 30 d, sendo denominados Controle<sup>TRS 10d</sup>, Controle<sup>TRS 30d</sup>, Teste<sup>TRS 10d</sup> e Teste<sup>TRS 30d</sup>. Após 5,5 h da 1ª troca de meio diária, 60 mL e 20 mL eram retirados dos reatores, respectivamente, para manter o TRS definido.

Por questões experimentais, a operação dos reatores foi dividida em 2 períodos. No primeiro, a adição de produto nos reatores Teste era realizada apenas na 1ª troca de meio do dia. Já no segundo período, o produto era adicionado nas 2 trocas de meio diárias.

No último período de operação dos biorreatores, foi feita a quantificação de SOUR, utilizando a própria alimentação dos reatores como fonte de substrato adicional (20 mL de licor misto + 40 mL de alimentação). Fez-se também a quantificação de EPS (substâncias poliméricas extracelulares). Os métodos analíticos estão descritos no Apêndice A.

### 8.3 Resultados e discussão

Após a partida, os biorreatores operaram por 5 dias sem adição de produto para adaptação do lodo às condições de operação. Após esse tempo, a concentração de biomassa nos reatores Controle<sup>TRS 10d</sup>, Teste<sup>TRS 10d</sup>, Controle<sup>TRS 30d</sup> e Teste<sup>TRS 30d</sup> era de 1055, 1080, 1100 e 1050 mg SST/L, respectivamente.

Os resultados desta operação, denominada Operação 5, encontram-se na Tabela 28 e Figura 21. Devido à variação da concentração de SST, a relação produto/biomassa não se manteve em 25 mg RL/g SST ao longo de toda a operação, conforme desejado. Entretanto, os valores da relação nos dois reatores Teste foram muito próximos ( $20 \pm 0,8$  e  $19 \pm 1,8$  mg RL/g SST no Período 1, e  $19 \pm 1,9$  e  $17 \pm 1,6$  mg RL/g SST no Período 2), indicando que as diferenças observadas nos resultados podem ser devido unicamente à alteração do TRS.

Tabela 28 – Efeito da adição biossurfactante do tipo ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com diferentes TRS.

Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 6) <sup>(a)</sup>	Período 2 (7 a 16)	Condição	Período 1 (1 a 6)	Período 2 (7 a 16)
Tempo (d)		6	10		6	10
TRS (d)		10	10		30	30
n <sup>(b)</sup>		2	4		2	4
[Produto] no reator (mg/L)	Teste	25 <sup>(c)</sup>	25 <sup>(d)</sup>	Teste	25 <sup>(c)</sup>	25 <sup>(d)</sup>
Produto utilizado	Teste	R90	R90	Teste	R90	R90
DQO alimentação (mg/L)	Controle Teste	1129 ± 20	1073 ± 70	Controle Teste	1129 ± 20	1073 ± 70
DQO total saída (mg/L)	Controle Teste	263 ± 135 359 ± 95	220 ± 39 220 ± 45	Controle Teste	159 ± 30 347 ± 50*	165 ± 42 363 ± 110*
DQO solúvel saída (mg/L)	Controle Teste	83 ± 17 99 ± 41	51 ± 3 72 ± 26	Controle Teste	79 ± 4 119 ± 45	51 ± 8 99 ± 33*
Redução de DQO total (%)	Controle Teste	76,9 ± 11,6 69,6 ± 5,9	79,4 ± 4,5 80,6 ± 4,3	Controle Teste	86,0 ± 2,4 70,6 ± 2,2*	84,5 ± 4,4 68,4 ± 8,4*
Redução de DQO solúvel (%)	Controle Teste	92,6 ± 1,6 91,4 ± 4,1	95,3 ± 0,5 93,7 ± 2,4	Controle Teste	93,0 ± 0,4 89,7 ± 4,5	95,2 ± 0,9 91,4 ± 2,2
pH alimentação	Controle Teste	7,7 ± 0,1	7,6 ± 0,2	Controle Teste	7,7 ± 0,1	7,6 ± 0,2
pH saída	Controle Teste	7,8 ± 0,1 8,0 ± 0,2	7,6 ± 0,1 7,6 ± 0,0	Controle Teste	7,9 ± 0,1 8,0 ± 0,3	7,7 ± 0,0 7,7 ± 0,0
SST (mg/L)	Controle Teste	1360 ± 64 1245 ± 49	1263 ± 71 1329 ± 126	Controle Teste	1490 ± 372 1298 ± 126	2037 ± 144 1508 ± 143*
SSV (mg/L)	Controle Teste	1140 ± 49 1028 ± 53	1113 ± 48 1193 ± 84	Controle Teste	1281 ± 311 1131 ± 116	1762 ± 118 1312 ± 118*
SSV/SST	Controle Teste	0,84 ± 0,00 0,83 ± 0,01	0,88 ± 0,01 0,90 ± 0,02	Controle Teste	0,86 ± 0,01 0,87 ± 0,00	0,86 ± 0,01 0,87 ± 0,02

Tabela 28 – Efeito da adição biossurfactante do tipo ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com diferentes TRS (cont.).

Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 6) <sup>(a)</sup>	Período 2 (7 a 16)	Condição	Período 1 (1 a 6)	Período 2 (7 a 16)
IVL (mL/g)	Controle	110 ± 5	122 ± 17	Controle	103 ± 16	106 ± 17
	Teste	84 ± 2*	90 ± 9*	Teste	76 ± 14	87 ± 12
Produto/Biomassa (mg RL/g SST)	Teste	20 ± 0,8	19 ± 1,8	Teste	19 ± 1,9	17 ± 1,6
Descarte de lodo (mg SST/d)	Controle	82 ± 4	76 ± 4	Controle	30 ± 7	41 ± 3
	Teste	75 ± 3	80 ± 8	Teste	26 ± 3	30 ± 3*
Redução no descarte (%)	Teste	8,5	-5,3	Teste	13	27*

Fonte: elaboração própria. <sup>(a)</sup>Tempo de operação no período, em dias. <sup>(b)</sup>Número de análises do período. <sup>(c)</sup>Adição de produto apenas na 1ª troca de meio, realizada pela manhã. <sup>(d)</sup>Adição de produto nas 2 trocas diárias de meio. \*Valores estatisticamente diferentes do respectivo Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).

Figura 21 – Efeito da adição biossurfactante do tipo ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com diferentes TRS.

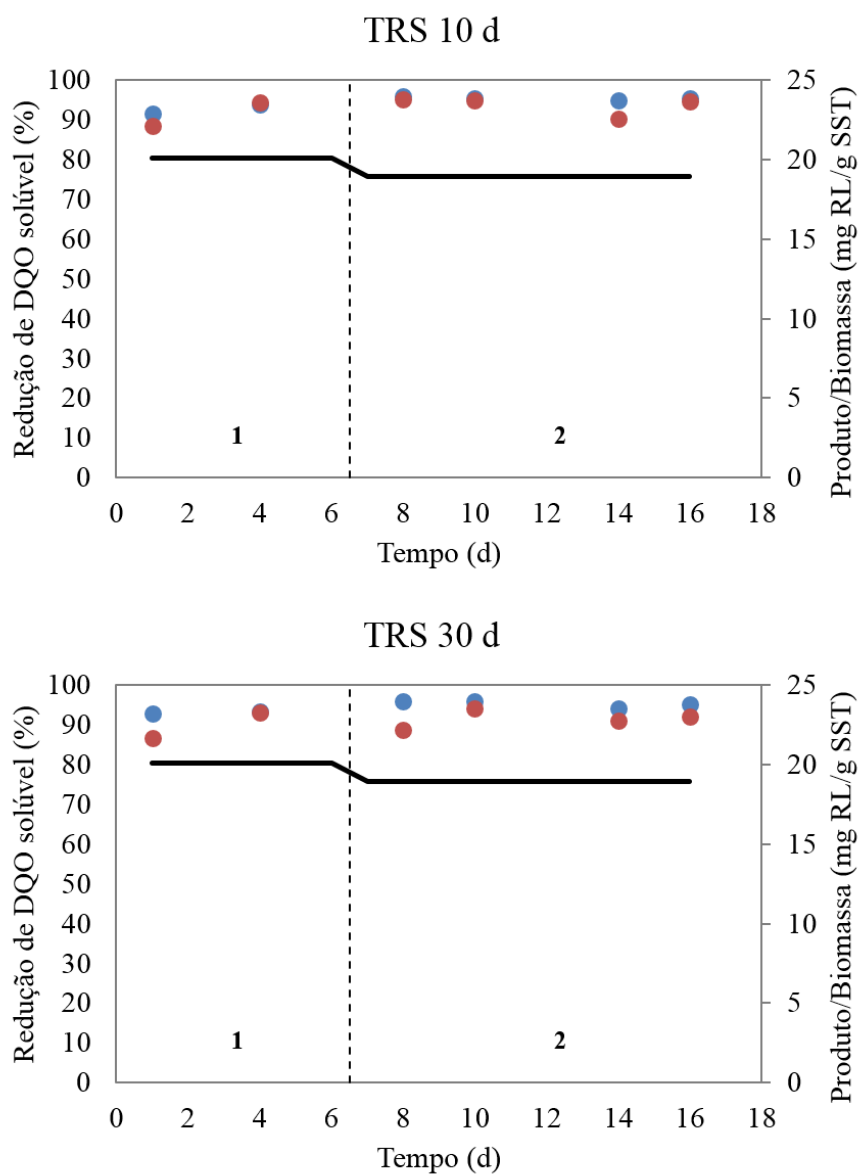
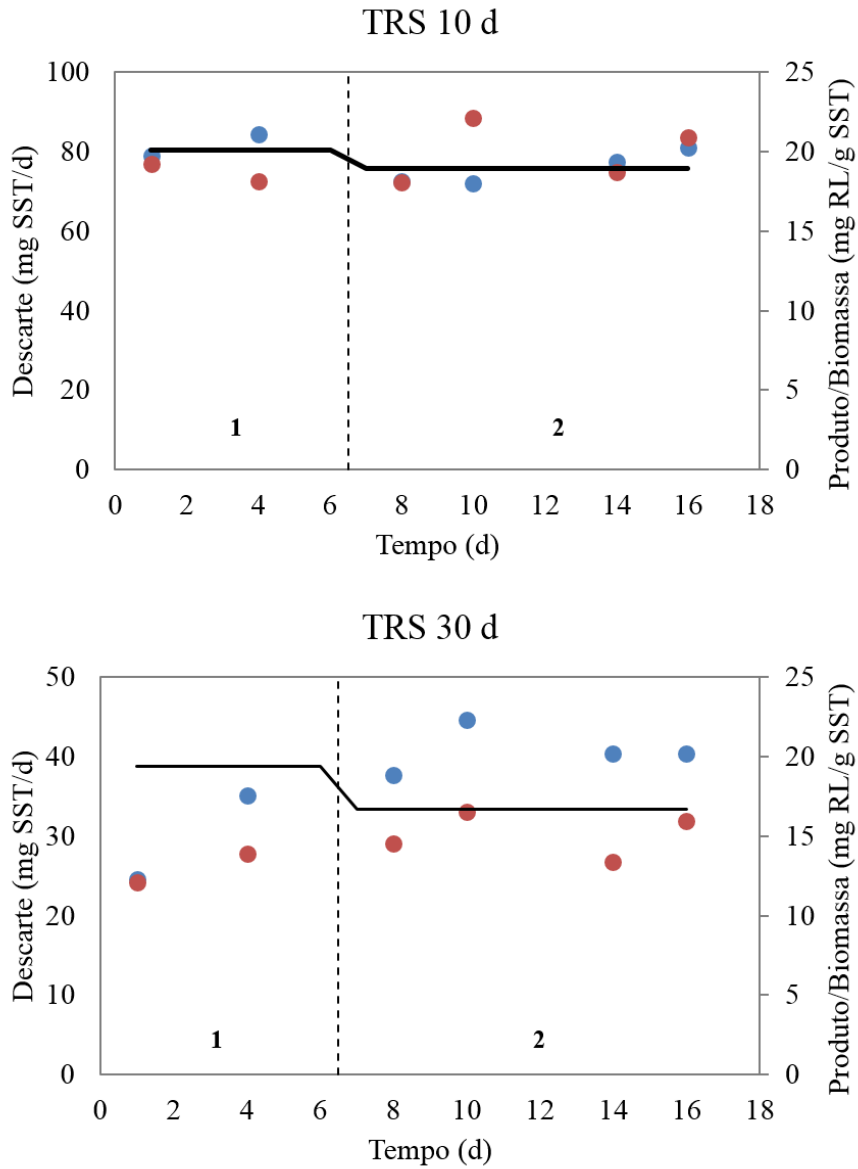


Figura 21 – Efeito da adição biossurfactante do tipo ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com diferentes TRS (cont.).



Fonte: elaboração própria. Pontos azuis (•) representam dados do biorreator Controle e pontos vermelhos (•) dados do biorreator Teste. A linha cheia (—) representa os valores médios da relação produto/biomassa de cada período. Linhas tracejadas (----) na vertical separam diferentes períodos de operação. Período 1: adição de RL somente na 1ª troca diária de meio. Período 2: adição de RL nas 2 trocas diárias de meio.



A análise estatística não apontou diferença significativa na redução de DQO solúvel. Nos reatores Teste, esse valor foi ligeiramente mais baixo em relação a seus respectivos Controles (Figura 21). Porém, quando se considera a DQO do produto adicionado (solução estoque de R90 com DQO 73667 mg/L) no balanço de massa (Equação (15)), observa-se, por exemplo, reduções de 99,9% nos reatores Teste e de 90,9% nos reatores Controle, ambos comparados no período 2 de operação. Logo, o biossurfactante adicionado não afetou a eficiência de redução de DQO no tratamento.

A DQO total do sobrenadante da 2ª troca de meio foi maior nos biorreatores Teste do que nos Controles, indicando maior presença de sólidos suspensos e, portanto, menos qualidade do efluente tratado. Porém, não foram observadas diferenças significativas nas relações DQO solúvel/DQO total. No Período 2, por exemplo, essas relações apresentaram valores iguais a  $0,23 \pm 0,03$  e  $0,33 \pm 0,10$  (ControleTRS 10d e TesteTRS 10d) e  $0,32 \pm 0,06$  e  $0,29 \pm 0,10$  (ControleTRS 30d e TesteTRS 30d), sendo as médias de cada Teste estatisticamente iguais aos seus respectivos Controles (teste t,  $\alpha$  0,05).

Apenas no Período 2 foi observada diferença significativa no descarte de lodo. A adição de 25 mg RL/L ( $17 \pm 1,6$  mg RL/g SST) associada a um TRS de 30 d reduziu o descarte de lodo em 27%, conforme observado na Tabela 28 e Figura 21. Este valor está de acordo com as faixas obtidas no teste rápido (item 7), porém ainda permite melhorias.

No item 6, levantou-se a hipótese de que a elevada biodisponibilidade do substrato teria feito com que a biomassa se mostrasse mais ativa, aumentando o efeito do biossurfactante. Contudo, isto não se comprovou nesta operação. Conforme os dados de SOUR apresentados na Tabela 29, observa-se que a taxa de consumo de oxigênio é mais baixa nos reatores que operaram com maior TRS, conforme esperado. Como este dado é de uma única amostra em um único dia de operação, não se pode afirmar que o efeito do biossurfactante se deve à menor atividade microbiana. Pode-se apenas afirmar que o TRS influencia a redução de lodo obtida com adição de biossurfactante do tipo ramnolipídeo. A Hipótese 4 foi, portanto, confirmada. A adição do produto R90 em RBS fez com que a SOUR dos biorreatores Teste fosse igual ou ligeiramente maior que seus Controles, confirmando os resultados obtidos no teste rápido apresentado no item 7.

Tabela 29 – Taxa de consumo de oxigênio do lodo em função da adição de produto e do TRS dos biorreatores.

Condição (TRS 10 d)	SOUR (mg O <sub>2</sub> /g SST.min)	Condição (TRS 30 d)	SOUR (mg O <sub>2</sub> /g SST.min)
Controle	2,20	Controle	1,42
Teste	2,15	Teste	1,76

Fonte: elaboração própria. Medida realizada no último dia de operação dos reatores, 5,5 h após a 1ª troca de meio.

Assim como observado nas operações anteriores, com biossurfactante produzido em laboratório, a adição do produto R90 reduziu o IVL em todas as condições avaliadas. Contudo, só mostrou diferença estatisticamente significativa no biorreator operando com TRS 10 d, que não apresentou redução no descarte de lodo. Entretanto, o fato de o período de operação ter sido curto e poucas amostras terem sido analisadas pode ter contribuído para os desvios padrões elevados e falta de significância estatística. Como as médias de IVL de ambos os biorreatores Teste foram menores que as dos Controles, pode-se considerar que há uma tendência de redução desse parâmetro mediante a adição de biossurfactante nos sistemas de tratamento.

Como observado no item 6, o biorreator Teste apresentou valores de IVL mais baixos que o Controle na maioria das operações avaliadas. A literatura já reporta uma correlação direta entre a concentração de EPS e o IVL: quanto maior a concentração de EPS no lodo, maior o valor observado para o IVL, com prejuízo na sedimentação do lodo (LI E YANG, 2007). Por não serem essenciais ao crescimento e à viabilidade de células livres (PAL E PAUL, 2013), EPS são produzidas no metabolismo secundário e, na presença de desacopladores metabólicos, esta produção é reduzida (CAMMAROTA E SANT'ANNA JR., 1998).

Além disso, a estrutura química dos ramnolípídeos engloba as partes glicolítica e não glicolítica, que é composta por 1 ou 2 cadeias de ácidos graxos (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). Quando acumulados nas células, ácidos graxos de cadeia longa atuam como desacopladores metabólicos através de movimento da forma não dissociada através da membrana, dissipando o gradiente de prótons (WOJTCZAK E SCHÖNFELD, 1993). Apesar das diferenças estruturais, supõe-se que o efeito dos RL possa ser semelhante ao observado com ácidos graxos de cadeia longa.

Com base nessas informações, caso os menores valores de IVL estejam relacionados a menores concentrações de EPS, isto pode ser um indício de que, em determinadas concentrações e condições, os ramnolípídeos podem agir como desacopladores metabólicos.

Tanto a fração fracamente ligada (LB-EPS) quanto a fração fortemente ligada (TB-EPS) de EPS foram quantificadas no último dia de operação dos biorreatores, não mostrando diferenças entre os reatores Testes e seus respectivos Controles. Para os reatores Controle<sup>TRS 10d</sup>,

Teste<sup>TRS10d</sup>, Controle<sup>TRS 30d</sup> e Teste<sup>TRS 30d</sup>, o lodo apresentou, respectivamente, 59, 49, 40 e 39 mg DQO/g SST (LB-EPS), e 33, 50, 43 e 40 mg DQO/g SST (TB-EPS). Por se tratar de uma única amostragem, não se pode descartar a hipótese levantada, principalmente porque o método de quantificação utilizado (DQO) pode não ter a sensibilidade necessária para a quantificação de EPS.

#### **8.4 Conclusões**

O TRS se mostrou uma variável relacionada ao efeito do biossurfactante na redução do descarte de lodo. A operação em bateladas sequenciais ( $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/L, e  $17 \pm 2$  mg RL/g SST) com TRS 30 d reduziu o descarte de lodo em 27%, enquanto que na operação com TRS 10 d, o produto não apresentou efeito. A Hipótese 4 foi, então, confirmada.

Novamente, a adição do biossurfactante reduziu o IVL nos biorreatores Teste, porém não se pôde associar tal variação a diferentes concentrações de EPS.



## 9 Conclusões

O biossurfactante do tipo ramnolípídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 avaliado neste estudo reduz o crescimento celular sem prejudicar a remoção de substrato, tanto em teste rápido quanto em sistemas de lodos ativados operando em bateladas sequenciais (RBS). A utilização de biossurfactantes com elevado grau de pureza faz com que o efeito dos mesmos fosse pronunciado, reduzindo a concentração mínima necessária.

O efeito observado com a adição do biossurfactante se mostrou dependente da concentração de RL no meio, da relação produto/biomassa, do tipo de inóculo utilizado e seu estado fisiológico, e da relação  $S_0/X_0$ .

Dois testes rápidos foram implementados (Tipo II e Tipo III) para avaliação preliminar do efeito do ramnolípídeo. O teste Tipo II, que utiliza meio de cultivo e inóculo comerciais (meio TSB e Polyseed), apresentou variação elevada nos resultados, não sendo a melhor opção para este objetivo, principalmente pela não adequação da fonte de microrganismos empregada como inóculo. O teste Tipo III, que utiliza inóculo proveniente de reatores de lodos ativados de laboratório com alimentação composta de efluente sintético com diferentes composições, também apresentou variação, mas bem menor quando comparado ao Tipo II.

No teste rápido Tipo II, a adição de 9 mg RL/L foi a concentração mínima necessária para observação do efeito (72% de redução em  $Y_{X/S}$ ), e a redução máxima foi obtida com 12 mg RL/L (92% de redução em  $Y_{X/S}$ ). No entanto, acima de 15 mg RL/L, a remoção de substrato foi altamente prejudicada.

No teste rápido Tipo III, a melhor condição para observação do efeito desejado do RL foi  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/L ou 25 mg RL/g SST, permitindo 50-75% de redução em  $Y_{X/S}$ , e taxa de consumo de substrato e taxa específica de consumo de oxigênio próximas às obtidas no Controle. Valores muito baixos de  $S_0/X_0$  não permitiram crescimento microbiano na presença de RL, não sendo uma condição desejada por não permitir renovação celular.

Os resultados obtidos nos testes conduzidos com diferentes misturas de congêneres do RL não apresentaram diferenças no crescimento microbiano, não sendo confirmado que diferentes congêneres do ramnolípídeo poderiam apresentar diferentes efeitos nos sistemas de lodos ativados.

Em RBS operando com TRH 5,5 h, TRS 20 d, efluente e lodo de refinaria de petróleo, o melhor resultado obtido foi com a adição de 50 mg RL/L ou 25 mg RL/g SST, que reduziu o descarte

de lodo em 41 a 52%, sem prejuízo da redução de DQO. Porém, a reprodutibilidade dos resultados se mostrou uma questão importante e, em alguns casos, observou-se até aumento no descarte de lodo. Na maior parte dos casos, a adição de RL nos reatores reduziu o IVL do lodo. A condição de operação influenciou os resultados obtidos, principalmente em relação a  $S_0/X_0$  e TRS. A condução de RBS com TRH 5,5 h, meio sintético e lodo de esgoto utilizando  $S_0/X_0$  1,06 g DQO/g SST, 25 mg RL/L e 17-20 mg RL/g SST, levou a 27% de redução no descarte de lodo com TRS 30 d, enquanto que não foi observada redução com TRS 10 d.

## 10 Outros experimentos e considerações finais

Conforme comentado anteriormente, a revisão bibliográfica realizada até o momento não mostrou estudos com (bios-)surfactantes adicionados em sistemas de lodos ativados com o objetivo de reduzir a geração de biomassa. Em geral, avalia-se a adição desses produtos como tensoativos, para aumentar a absorção de compostos hidrofóbicos nos efluentes. Como nem todas as publicações informam a concentração do licor misto, não é possível verificar o efeito de redução da geração de biomassa na literatura. Apesar de os resultados obtidos neste estudo terem se mostrado muito variáveis, diversos fatores que podem afetar o processo foram identificados, e este pode ser utilizado como ponto de partida para estudos posteriores.

Por se tratar da adição de biossurfactante em ambiente aeróbio, a formação de espuma torna-se uma questão importante. Sempre que se observou o arraste de biomassa do sistema pela espuma, a aeração foi reduzida de modo a manter ambas no sistema. A adição de antiespumante poderia minimizar o problema, e foi avaliada no teste rápido Tipo III. Porém, a adição de mais um composto representa mais um fator de influência no metabolismo microbiano e, por isso, também foi adicionado na condição Controle. A adição de antiespumante prejudicou o monitoramento do processo, pois aparentemente foi adsorvido pelo lodo e liberado com o tempo, influenciando a análise de DQO solúvel. O consumo de DQO, por exemplo, não apresentou perfil correspondente a uma cinética de 1ª ordem, mostrando a influência do antiespumante no processo. Ao afetar a DQO solúvel influenciou o valor de  $Y_{X/S}$  e, por isto, não se deu continuidade aos testes com antiespumante.

O mecanismo de ação que faz com que o ramnolípídeo reduza a geração de biomassa em lodos ativados não foi determinado. Uma possibilidade é sua ação nas membranas biológicas, afetar a integridade das mesmas. Biossurfactantes têm a capacidade de se manter ligados à bicamada lipídica, e sob determinadas concentrações e períodos de exposição são capazes de destruir a integridade das membranas, promovendo danos irreversíveis, tais como perda de funções de organelas e lise celular (BALLOT, 2009; WANG *et al.*, 2005). Acima da CMC ocorre lise celular decorrente da solubilização das membranas pelo (bios)surfactante, enquanto em concentrações abaixo da CMC ocorrem desordens enzimáticas que podem liberar um sinal de apoptose (LI E CHEN, 2009).

Lang, Katsiwela e Wagner (1989) avaliaram a atividade antimicrobiana de MRL e DRL que sofreram (RL-II e RL-IV) ou não (mistura RL-I/III) hidrólise alcalina, a qual substitui a cadeia de carbono da estrutura por um átomo de hidrogênio. Ao avaliar o crescimento de *Pseudomonas*

*aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Streptococcus faecium* na presença de 2 g RL/L, observaram que RL-II e RL-IV não inibiram o crescimento de nenhum dos microrganismos citados, enquanto a mistura RL-I/III só não inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*. Além disso, na determinação da CMI<sub>50</sub>, RL-II não inibiu o crescimento, enquanto RL-I/III apresentou valores de 34 (*B. subtilis*) e 350 mg/L (*S. epidermidis*). Como a cadeia de carbono garante as propriedades hidrofóbicas da molécula e, conseqüentemente, a interação com as membranas celulares, tais resultados são um indício de que o mecanismo de ação de ramnolipídeos pode ser a perda de integridade das membranas.

O efeito dos ramnolipídeos nas membranas celulares pode ser avaliado através de microscopia eletrônica, porém não foi possível fazer essa avaliação neste estudo. Contudo, após a definição da melhor condição para obtenção dos resultados, pode-se fazer essa avaliação.

Outra possibilidade levantada é a dos ramnolipídeos atuarem como desacopladores metabólicos sob determinadas condições, já que na maioria dos casos se observou aumento da SOUR e redução do IVL (que pode estar associada ou não à redução de EPS). Além disso, sua estrutura apresenta semelhanças com ácidos graxos de cadeia longa, e estes já foram identificados como desacopladores (WOJTCZAK E SCHÖNFELD, 1993).

A comprovação da hipótese de que ramnolipídeos poderiam atuar como desacopladores seria através de metodologia descrita por Podella *et al.* (2009), com o objetivo de avaliar o transporte de íons H<sup>+</sup> através de uma membrana artificial. O conjunto consiste em uma cuba de acrílico com dois compartimentos separados por uma membrana de celulose (47 mm, 0,45 µm), previamente imersa em azeite de oliva extra virgem, seguida de compressão em papel de filtro para remover o excesso. Um dos compartimentos contém HCl 0,1 mmol/L e o outro, NaOH 0,1 mmol/L, conectados através de uma ponte salina. Através de monitoramento do pH, o transporte de prótons seria avaliado. Para garantir a efetividade da metodologia, o composto dnP é utilizado como Controle positivo. O resultado reportado por Podella *et al.* (2009), que avaliou a adição de dnP e monitoramento de pH no compartimento básico, mostrou redução de pH de 12 para 9 em 24 h de experimento.

Como ponto de partida para verificar a metodologia proposta, realizou-se um experimento Controle, sem adição de qualquer produto, observando queda de pH no compartimento básico (de 10,2 para 7,4 em 21 h), decidindo-se, então, avaliar o pH do compartimento ácido. Ao conduzir um experimento com dnP adicionado no compartimento ácido na mesma concentração usada por Podella *et al.* (2009), observou-se queda de 3,7 para 3,5 ao longo de 96 h. Por



apresentar divergências de resultados em relação à referência original, não se deu continuidade a esta etapa. Porém, abre-se margens para mais testes futuros. Além dessa metodologia (PODELLA *et al.*, 2009), a hipótese de desacoplamento metabólico também pode ser avaliada através de correlações entre IVL, EPS, SOUR e redução de lodo. Portanto, em testes futuros é muito importante que se avalie todos esses parâmetros.

Outro mecanismo possível para justificar a ação de ramnolipídeos na redução da geração de biomassa em lodos ativados seria a morte e lise celular de algumas espécies mais sensíveis da população microbiana. Desse modo, apenas as espécies capazes de manter seu metabolismo na presença do produto apresentariam crescimento, já que o efeito antimicrobiano dos biossurfactantes é altamente dependente do organismo alvo (BALLOT, 2009; BENINCASA *et al.*, 2004; HABA *et al.*, 2003).

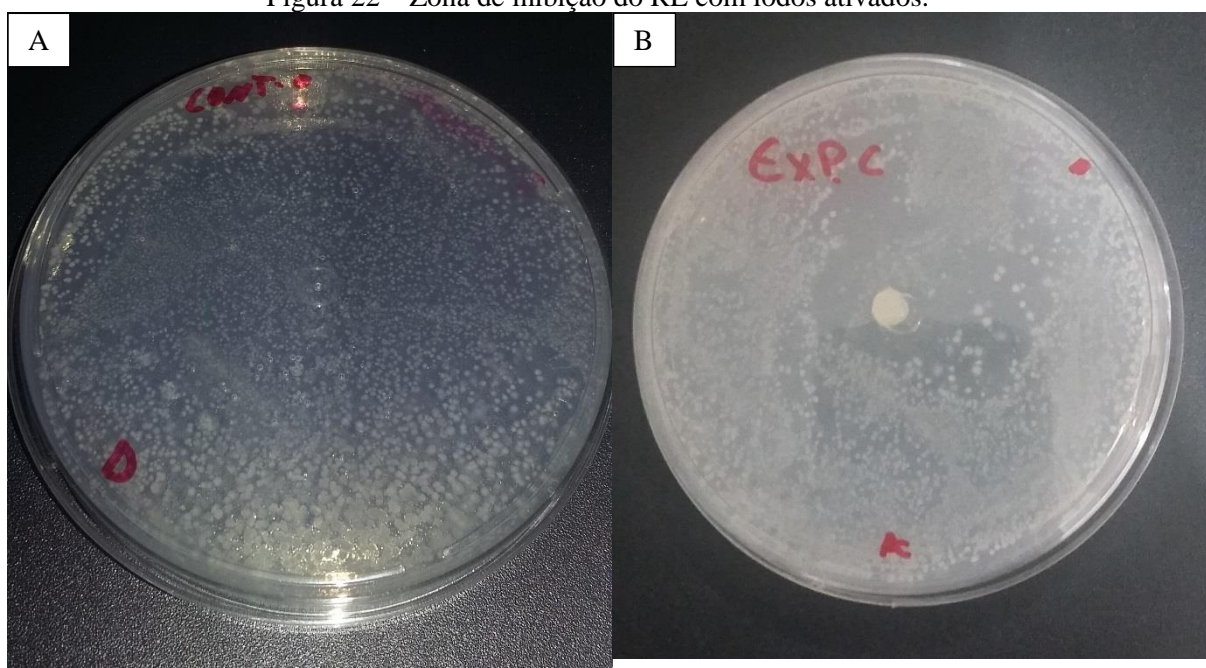
Para verificar se existe de fato esta possibilidade, foi feita uma avaliação do crescimento por plaqueamento. Foi utilizado lodo oriundo de RBS em operação para gerar biomassa ativa (item 7.2.2), diluído em solução de NaCl 0,5 g/L para se atingir 1000 mg SST/L, e biossurfactante comercial (produto R90) como produto teste. O meio TSB (DQO 1060 mg/L) foi misturado com ágar e adicionado em placas de Petri. A suspensão de lodo (0,1 mL), contendo (Teste) ou não (Controle) o produto, foi então adicionada no meio solidificado através da técnica de *spread plate* e as placas foram incubadas em estufa a 30°C por 24 h. Em seguida, foi feita a contagem de colônias. A melhor diluição da suspensão de lodo contendo 1000 mg SST/L foi 10<sup>-9</sup>. Três experimentos foram conduzidos em paralelo: Controle, Teste<sup>25</sup> (25 mg RL/L na diluição 10<sup>-9</sup>) e Teste<sup><25</sup> (suspensão de lodo contendo 1000 mg SST/L e 25 mg RL/L, só então sendo diluída a 10<sup>-9</sup>). Os resultados foram, respectivamente, 2,81x10<sup>6</sup>, 2,21x10<sup>6</sup>, e 1,70x10<sup>6</sup> UFC/mL. Apesar de a ANOVA e o Teste de Tukey ( $\alpha$  0,1) indicarem diferenças significativas entre os valores de UFC, microbiologicamente não se pode afirmar que os resultados foram diferentes entre si, já que a ordem de grandeza foi igual em todos os casos.

Um teste de difusão em ágar foi feito para avaliação da atividade antimicrobiana (DOUGHERTY E PUCCI, 2012). A suspensão de lodo (0,1 mL, 1000 mg SST/L) foi aplicada no meio solidificado através da técnica de *spread plate* e um papel de filtro de 0,5 mm de diâmetro embebido em 10 µL de solução de produto (25 mg RL/L) foi aplicado no centro da placa (em quatro réplicas). Após incubação a 30°C por 24 h, as zonas de inibição foram determinadas, apresentando 12 ± 1 cm<sup>2</sup>. Conforme observado na Figura 22, o resultado obtido não é o tipicamente encontrado na literatura, pois trata-se de uma população mista de microrganismos, e não uma cultura pura. É possível visualizar apenas uma região na qual o

crescimento não é homogêneo, como ocorre no Controle. Isso comprova que o RL afeta diferentemente os microrganismos do lodo ativado.

Apesar de ser um resultado muito preliminar e sem otimização, levanta a hipótese de que o produto aplicado em sistemas de lodos ativados é capaz de modificar a composição microbiana do lodo. Com isso, caso se perca o efeito ao longo do tempo, não significa que a biomassa necessariamente se adaptou ao produto adicionado, mas que restaram no sistema apenas as espécies não impactadas desde o início.

Figura 22 – Zona de inibição do RL com lodos ativados.



Fonte: acervo pessoal. (A) Controle, 1000 mg SST/L. (B) Teste, 1000 mg SST/L, papel de filtro imerso em solução contendo 25 mg RL/L.

Uma vertente da aplicação de biossurfactantes na redução de lodo é como agentes auxiliares para melhorar a digestão de lodo. Ao adicionar surfactantes em digestor aeróbio para a desintegração bioquímica do excesso de lodo, atingiu-se reduções de 41 a 65% na geração de lodo em duas ETE (STARK, [S.D.]; STARK E KALOS, [s.d.]). Em digestores anaeróbios, diversos estudos em escala laboratorial mostram que esses compostos são capazes de solubilizar parcialmente a matriz polimérica dos flocos de lodo, melhorando a hidrólise e a acidogênese, e promovendo maiores rendimentos de metano (GUAN *et al.*, 2017).

A adição de biossurfactante do tipo ramnolípídeo foi avaliada na digestão aeróbia e anaeróbia de lodo ativado oriundo de ETE. Porém, alguns contratempos foram observados. A digestão de lodo já é uma tecnologia consolidada. Apesar de a literatura comentar que a eficiência do processo é reduzida quando o teor de sólidos do lodo a ser digerido é menor que o recomendado

(ANDREOLI, VON SPERLING E FERNANDES, 2007; METCALF E EDDY, 2016), o que se observou é que a eficiência, na verdade é quase nula.

Foram conduzidos quatro experimentos no total, um com digestão aeróbia (Experimento 1), e três com digestão anaeróbia (Experimentos 2, 3 e 4), todos avaliando o efeito do produto comercial R90. O Experimento 1 (digestão aeróbia) foi conduzido a 30°C, com 14525 mg SST/L inicial (SSV/SST 0,59) e concentrações de 61 a 393 mg RL/L (4,2 a 27 mg RL/g SST). Após 10 d de digestão, observou-se no máximo 8% de redução em SST e a relação SSV/SST reduziu para apenas 0,57. Considerando o erro das análises, esses valores podem ser considerados desprezíveis. Além disso, em função das concentrações de RL serem muito elevadas, a espuma tornou-se um fator muito crítico. O volume de solução estoque de R90 não pôde ser adicionado de uma vez, sendo dividido ao longo de 5 dias. Desse modo, a concentração de RL no reator não foi a desejada. Juntando a baixa redução obtida em 10 d com o fato de ser tecnicamente inviável avaliar as concentrações de RL necessárias, decidiu-se por avaliar o efeito apenas na digestão anaeróbia.

A digestão anaeróbia foi conduzida em respirômetro AMPTS II, em frascos de 500 mL com 300 mL de volume útil, agitação intermitente (1 min ligada / 10 min desligada) e 30°C. Nos Experimentos 2 e 3, foram avaliadas concentrações de 5 a 300 mg RL/g SST (equivalente a 49 a 2935 mg RL/L), de modo a atender a faixa avaliada nos sistemas de lodos ativados e também a faixa que se mostrou promissora em outros estudos com adição de RL para melhorar a digestão anaeróbia (LUO *et al.*, 2013), bem como o Controle. No Experimento 4, apenas o Controle (sem adição de RL) foi avaliado, em diferentes concentrações de sólidos. Os experimentos foram realizados em duplicata (2 e 3) e triplicata (4).

O Experimento 2 consistiu de uma batelada com duração de 21 d, com pH original do lodo (6,2) e concentração inicial de sólidos igual a 10060 mg SST/L (SSV/SST 0,67). Ao final do experimento, observou-se aumento dos SST (11210 a 14120 mg/L) e da relação SSV/SST (0,65 a 0,70). Provavelmente, o crescimento observado foi devido ao RL ter sido utilizado como substrato. No caso da condição Controle, a única justificativa encontrada é o fato de o lodo ter muitos orgânicos adsorvidos, que foram utilizados como substrato ao longo do tempo. Porém, o mesmo não foi observado em outros estudos do grupo (SILVEIRA, 2016). A produção de metano aumentou do Controle até 15 mg RL/g SST. A partir de 25 mg RL/g SST, a produção apresentou queda, provavelmente em decorrência da inibição de ácidos orgânicos gerados na degradação anaeróbia do biossurfactante. Apesar de não ter sido uma digestão propriamente dita, já que não houve redução no teor de sólidos voláteis do lodo, observou-se que a adição de

RL prejudicou a filtrabilidade do lodo, avaliada pela resistência específica à filtração e pelo tempo de filtração de 50% do volume. Enquanto o Controle apresentou 6553 m/kg e 2,3 min, a adição de 25 e 300 mg RL/g SST apresentaram, respectivamente, 31145 m/kg e 12 min, e 52263 m/kg e 33 min.

No Experimento 3, foram avaliadas as mesmas condições, porém ajustando o pH do lodo para 7,0 com  $\text{NaHCO}_3$  e conduzindo o processo em modo semi-contínuo. A cada semana, 100 mL do volume útil era substituído por lodo novo (juntamente com RL), num total de 6 semanas. Novamente, a relação SSV/SST não apresentou queda significativa em relação ao esperado de uma digestão anaeróbia. Enquanto o lodo original apresentou SSV/SST de 0,64, no último dia de operação (42 d) esse valor variou entre 0,59 e 0,61 em todas as condições, inclusive no Controle. O balanço de massa considerando todas as trocas de lodo, mostrou que a redução na massa de SSV aos 42 d no Controle foi de apenas 10%. Utilizando lodo da mesma origem, Silveira (2016) obteve 60% de redução em STV com 12 d de digestão, e a relação STV/ST reduziu de 0,60 para 0,35. As diferenças entre os estudos estão apenas na data de coleta e concentração de sólidos, que era ligeiramente maior (17500 mg ST/L).

O Experimento 4 foi conduzido sem avaliar o efeito do biossurfactante, apenas para verificar se a ausência de digestão do lodo se deu pela baixa concentração de sólidos. Para tal, foi feita uma batelada de 60 d, a 30°C. Utilizando lodo com 9040 mg SST/L (SSV/SST 0,59) e 21110 mg SST/L (SSV/SST 0,57), de mesma origem que os anteriores, porém coletado em dias diferentes. Também se observou aumento na concentração de sólidos sem redução no percentual de sólidos voláteis, com valores iguais a  $12883 \pm 408$  mg SST/L (SSV/SST 0,59) e  $24704 \pm 560$  mg SST/L (SSV/SST 0,56). Como os resultados preliminares não foram satisfatórios, não foi possível dar continuidade aos estudos de digestão de lodo.

Com base no exposto até o momento, futuros trabalhos com adição de (bios)surfactantes em lodos ativados devem incluir as seguintes modificações:

- Medir a CMC na condição exata de cada teste, de modo a verificar se o valor se altera, pois este influencia diretamente na relação entre monômeros e agregados e, conseqüentemente, no efeito do produto.
- Avaliar diferentes sistemas de aeração de modo a reduzir a espuma nos reatores de lodos ativados.
- Retomar os experimentos com a membrana artificial para verificar se o produto pode atuar como desacoplador metabólico.

- Analisar IVL, EPS e SOUR de modo a buscar correlações que possam justificar o efeito do produto na redução da geração de biomassa.
- Analisar por microscopia eletrônica as amostras de lodo que apresentarem crescimento reduzido, para verificar se a integridade das membranas biológicas é afetada.

Como projeto específico para o futuro, propõe-se a retomada do teste rápido Tipo II, porém com método analítico diferente. Utilizando frascos agitados e baixas concentrações de biomassa, o problema da espuma é eliminado e, desta forma, mais informações podem ser obtidas. Pode-se utilizar conversão de absorvância em peso seco para quantificação da biomassa e DQO solúvel ou C-org solúvel para quantificação de substrato, porém deve-se garantir a total separação das células na filtração. O inóculo utilizado pode ser sobrenadante de lodo ativado, desde que seja levado ao vórtex para quebrar os flocos, promovendo crescimento homogêneo das células. Propõe-se avaliar o efeito do estado fisiológico do inóculo, através da adição de produto em diferentes fases do crescimento. Além disso, também deve-se avaliar, de forma independente, os efeitos da concentração de produto e da relação produto/biomassa. E como se levantou a hipótese de a biodisponibilidade de substrato influenciar o resultado, diferentes substratos podem também ser avaliados para levantar o máximo de informação possível.

Outra possibilidade de estudo é com relação ao efeito dos produtos adicionados na diversidade microbiana. A avaliação da diversidade ajudará a entender o mecanismo de ação e poderá indicar a possibilidade de perda de efeito do produto. Além disso, como a adição de produtos no tanque de aeração é uma tecnologia tecnicamente simples, ao entender as mudanças microbiológicas que ocorrem, pode-se pensar na utilização de produtos diferentes ao longo do tempo. Por exemplo, se o consórcio microbiano adaptado ao dnP é diferente do consórcio microbiano adaptado ao ramnolípídeo, uma vez que se observa perda do efeito de redução de lodo, pode-se alternar o produto adicionado para manter a redução no nível desejado. Contudo, são estudos complexos que precisam ser efetuados para viabilizar a redução de excesso de lodo.

Por último, propõe-se a aplicação de (bios)surfactantes em reatores biológicos de membrana (MBR). Dois grandes problemas nesses sistemas são a baixa transferência de oxigênio devido às elevadas concentrações de biomassa e o *fouling*, que pode ser decorrente da adesão de células microbianas na superfície das membranas (DEZOTTI, SANT'ANNA JR. E BASSIN, 2011; SANTANNA JR., 2010). Como essas substâncias são capazes de reduzir a coalescência (Stark e Kalos, [s.d.]), podem favorecer a transferência de oxigênio; e como são capazes de inibir a formação de biofilmes (ARAUJO *et al.*, 2016), podem reduzir o *fouling*.



## Referências

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M. R.; CASALS, M.; GARCÍA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. **Langmuir**, v. 17, n. 5, p. 1367–1371, 2001.

ALEXANDRE, V. M. F. **Redução de descarte de lodo em sistema de Lodos Ativados tratando efluente de refinaria de petróleo**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2013.

ALEXANDRE, V. M. F.; CASTRO, T. M. S. DE; ARAÚJO, L. V. DE; SANTIAGO, V. M. J.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C. Minimizing solid wastes in an activated sludge system treating oil refinery wastewater. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 103, p. 53–62, 2016.

ALEXANDRE, V. M. F.; CERQUEIRA, A. C. F. P. DE; SANTIAGO, V. M. J.; CAMMAROTA, M. C. Bioproducts for sludge reduction in activated sludge systems treating oil refinery wastewater. **Oil & Gas Science and Technology – Revue d’IFP Energies nouvelles**, v. 71, n. 2, 2016.

ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. (EDS.). Lodo de esgotos: tratamento e disposição final (vol 6). *In: Princípio do tratamento biológico de águas residuárias*. 1. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2001. p. 484.

ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. (EDS.). Sludge treatment and disposal (vol 6). *In: Biological Wastewater Treatment Series*. Londres: IWA Publishing, 2007. p. 244.

APHA. **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**. 21. ed. Washington, DC, New York: APHA, AWWA, WEF, 2005.

ARAGÓN, C.; QUIROGA, J. M.; COELLO, M. D. Comparison of four chemical uncouplers for excess sludge reduction. **Environmental technology**, v. 30, n. 7, p. 707–714, 2009.

ARAÚJO, L. V. DE. **Biossurfactantes: potencial de uso na inibição da adesão de micro-organismos indesejáveis na indústria de alimentos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2013.

ARAÚJO, L. V. DE; GUIMARÃES, C. R.; MARQUITA, R. L. DA S.; SANTIAGO, V. M. J.; SOUZA, M. P. DE; NITSCHKE, M.; FREIRE, D. M. G. Rhamnolipid and surfactin: Anti-adhesion/antibiofilm and antimicrobial effects. **Food Control**, v. 63, p. 171–178, maio 2016.

AUGER, R. L.; JACOBSON, A. M.; DOMACH, M. M. Effect of nonionic surfactant addition on bacterial metabolism of naphthalene: Assessment of toxicity and overflow metabolism potential. **Journal of Hazardous Materials**, v. 43, n. 3, p. 263–272, 1995.

BALLOT, F. **Bacterial production of antimicrobial biosurfactants**. [s.l.] University of Stellenbosch, 2009.

BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface

properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 1, p. 1–8, 2004.

BROOKES, A. **Immersed membrane bioreactors for produced water treatment**. [s.l.] Cranfield University Adam Brookes, 2005.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed Editora S.A., 2007.

CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANNA JR., G. L. Metabolic blocking of exopolysaccharides synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n. 1, p. 1–4, 1998.

CHEN, G. H.; MO, H. K.; LIU, Y. Utilization of a metabolic uncoupler, 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide (TCS) to reduce sludge growth in activated sludge culture. **Water Research**, v. 36, n. 8, p. 2077–2083, 2002.

CHEN, G. W.; YU, H. Q.; LIU, H. X.; XU, D. Q. Response of activated sludge to the presence of 2,4-dichlorophenol in a batch culture system. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1758–1763, 2006.

CHEN, G. W.; YU, H. Q.; XI, P. G. Influence of 2,4-dinitrophenol on the characteristics of activated sludge in batch reactors. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 4, p. 729–733, 2006.

CHEN, G. W.; YU, H. Q.; XI, P. G.; XU, D. Q. Modeling the yield of activated sludge in the presence of 2,4-dinitrophenol. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, n. 1, p. 150–156, 2008.

CHUDOBA, P.; CHEVALIER, J. J.; CHANG, J.; CAPDEVILLE, B. Effect of anaerobic stabilization of activated sludge on its production under batch conditions at various S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> ratios. **Water Science and Technology**, v. 23, n. 4–6, p. 917–926, 1991.

DAS, P.; YANG, X. P.; MA, L. Z. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. DEC, p. 1–8, 2014.

DEZOTTI, M.; SANT'ANNA JR., G. L.; BASSIN, J. P. **Processos biológicos avançados para tratamentos de efluentes e técnicas de biologia molecular para o estudo da diversidade microbiana**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

DOUGHERTY, T. J.; PUCCI, M. J. (EDS.). **Antibiotic Discovery and Development**. Boston, MA: Springer US, 2012.

EBRAHIMI, M.; KAZEMI, H.; MIRBAGHERI, S. A.; ROCKAWAY, T. D. An optimized biological approach for treatment of petroleum refinery wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 3, p. 3401–3408, 2016.

EIKELBOOM, D. H. **Process control of activated sludge plants by microscopic investigation**. Londres: IWA Publishing, 2000.



EPA. **Waste water treatment manuals: primary, secondary and tertiary treatment.** Ardcahan (Ireland): EPA (Environmental Protection Agency), 1997.

FANELLI, D.; COSTAS, R.; IOANNIDIS, J. P. A. Meta-assessment of bias in science. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 14, p. 3714–3719, 2017.

FANG, F.; HU, H.-L.; QIN, M.-M.; XUE, Z.-X.; CAO, J.-S.; HU, Z.-R. Effects of metabolic uncouplers on excess sludge reduction and microbial products of activated sludge. **Bioresource Technology**, v. 185, p. 1–6, jun. 2015.

FENG, X.-C.; GUO, W.-Q.; CHEN, C.; YANG, S.-S.; JIN, W.-B.; REN, N.-Q.; ZHENG, H.-S.; DU, J.-S.; LIU, B. Treatability study of 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide (TCS) combined with 2,4,6-trichlorophenol (TCP) to reduce excess sludge production in a sequence batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 642–646, set. 2013.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P. DA; SANTOS, W. N. L. DOS; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B. DE; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 2–14, 2007.

FOLADORI, P.; ANDREOTTOLA, G.; ZIGLIO, G. **Sludge reduction technologies in wastewater treatment plants.** Londres: IWA Publishing, 2010.

GHASEMI, A.; ZAHEDIASL, S. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 486–489, 1 dez. 2012.

GINESTET, P. (ED.). **Comparative evaluation of sludge reduction routes.** Londres: IWA Publishing, 2007.

GLANTZ, S. A. **Princípios de bioestatística.** 7. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2014.

GONZÁLEZ MARTÍNEZ, T.; BRÄUTIGAM, K.-R.; SEIFERT, H. The potential of a sustainable municipal waste management system for Santiago de Chile, including energy production from waste. **Energy, Sustainability and Society**, v. 2, n. 1, p. 14, 2012.

GUAN, R.; YUAN, X.; WU, Z.; WANG, H.; JIANG, L.; LI, Y.; ZENG, G. Functionality of surfactants in waste-activated sludge treatment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 1433–1442, 2017.

GUO, W. Q.; YANG, S. S.; XIANG, W. S.; WANG, X. J.; REN, N. Q. Minimization of excess sludge production by in-situ activated sludge treatment processes - A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1386–1396, 2013.

HABA, E.; PINAZO, A.; JAUREGUI, O.; ESPUNY, M. J.; INFANTE, M. R.; MANRESA, A. Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 3, p. 316–322, 2003.

HABA, E.; PINAZO, A.; PONS, R.; PÉREZ, L.; MANRESA, A. Complex rhamnolipid mixture characterization and its influence on DPPC bilayer organization. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1838, n. 3, p. 776–783, 2014.

HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1207–1219, 2012.

HENZE, M.; LOOSDRECHT, M. C. M. VAN; EKAMA, G. A.; BRDJANOVIC, D. (EDS.). **Biological Wastewater Treatment: Principles, Modelling and Design**. London, UK: IWA Publishing, 2008.

HOLLINGWORTH, R. M. Inhibitors and uncouplers of mitochondrial oxidative phosphorylation. In: KRIEGER, R. I. (Ed.). **Handbook of Pesticide Toxicology**. 2. ed. Londres: Academic Press, 2001. p. 1169–1261.

İKIZLER, B.; ARSLAN, G.; KIPCAK, E.; DIRIK, C.; ÇELENK, D.; AKTUĞLU, T.; HELVACI, Ş.; PEKER, S. Surface adsorption and spontaneous aggregation of rhamnolipid mixtures in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 519, p. 125–136, 2017.

INGRAM, L. O. Ethanol tolerance in bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 305–319, 1990.

ISHIGAMI, Y.; GAMA, Y.; NAGAHORA, H.; YAMAGUCHI, M.; NAKAHARA, H.; KAMATA, T. The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. **Chemistry letters**, v. 16, n. 5, p. 763–766, 1987.

JAMES, P. The sustainability cycle: a new tool for product development and design. **The Journal of Sustainable Product Design**, n. 2, p. 52–57, 1997.

KACPRZAK, M.; NECZAJ, E.; FIJAŁKOWSKI, K.; GROBELAK, A.; GROSSER, A.; WORWAG, M.; RORAT, A.; BRATTEBO, H.; ALMÅS, Å.; SINGH, B. R. Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. **Environmental Research**, v. 156, n. January, p. 39–46, 2017.

KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. (EDS.). Biosurfactants: production and utilization - process, technologies and economics (vol 159). In: **Biosurfactants**. Boca Raton: CRC Press, 2015. .

KRONEMBERGER, F. D. A. **Produção de rhamnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2007.

KRONEMBERGER, F. D. A.; BORGES, C. P.; FREIRE, D. M. G. **Membrane assisted pilot scale bioreactor for biosurfactant production** International Congress on Membranes and Membrane Processes. **Anais...**Amsterdam: Anais do International Congress on Membranes and Membrane Processes - ICOM 2011, 2011

KRONEMBERGER, F. D. A.; SANTA ANNA, L. M. M.; FERNANDES, A. C. L. B.; MENEZES, R. R. DE; BORGES, C. P.; FREIRE, D. M. G. Oxygen-controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 147, n. 1–3, p. 33–45, 12 mar. 2008.

LACROIX, N.; ROUSSE, D. R.; HAUSLER, R. Anaerobic digestion and gasification coupling for wastewater sludge treatment and recovery. **Waste management & research**, v. 32, n. 7, p. 608–613, 2014.

LANG, S.; KATSIWELA, E.; WAGNER, F. Antimicrobial effects of biosurfactants. **Lipid / Fett**, v. 91, n. 9, p. 363–366, 1989.

LEBLANC, R. J.; MATTHEWS, P.; RICHARD, R. P. (EDS.). **Global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource**. [s.l.] UN-HABITAT, 2008.

LEBRÓN-PALER, A.; PEMBERTON, J. E.; BECKER, B. A.; OTTO, W. H.; LARIVE, C. K.; MAIER, R. M. Determination of the acid dissociation constant of the biosurfactant monorhamnolipid in aqueous solution by potentiometric and spectroscopic methods. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 22, p. 7649–7658, 2006.

LI, J. L.; CHEN, B. H. Surfactant-mediated biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Materials**, v. 2, n. 1, p. 76–94, 2009.

LI, X. Y.; YANG, S. F. Influence of loosely bound extracellular polymeric substances (EPS) on the flocculation, sedimentation and dewaterability of activated sludge. **Water Research**, v. 41, n. 5, p. 1022–1030, 2007.

LICHTENBERG, D. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. **BBA - Biomembranes**, v. 821, n. 3, p. 470–478, 1985.

LIU, Y. Bioenergetic interpretation on the S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> ratio in substrate-sufficient batch culture. **Water Research**, v. 30, n. 11, p. 2766–2770, 1996.

\_\_\_\_\_. Effect of chemical uncoupler on the observed growth yield in batch culture of activated sludge. **Water Research**, v. 34, n. 7, p. 2025–2030, 2000.

LIU, Y.; CHEN, G. H.; PAUL, E. Effect of the S<sub>0</sub>/X<sub>0</sub> ratio on energy uncoupling in substrate-sufficient batch culture of activated sludge. **Water Research**, v. 32, n. 10, p. 2883–2888, 1998.

LIWARSKA-BIZUKOJC, E.; BIZUKOJC, M. Effect of selected anionic surfactants on activated sludge flocs. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 660–668, 2006.

LOTFABAD, T. B.; SHAHCHERAGHI, F.; SHOORAJ, F. Assessment of antibacterial capability of rhamnolipids produced by two indigenous *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 29–35, 2013.

LUO, K.; YE, Q.; YI, X.; YANG, Q.; LI, X. M.; CHEN, H. B.; LIU, X.; ZENG, G. M. Hydrolysis and acidification of waste-activated sludge in the presence of biosurfactant rhamnolipid: effect of pH. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5597–

5604, 2013.

MANSON, R. L.; GUNST, R. F.; HESS, J. L. **Statistical design and analysis of experiments with applications to engineering and science**. 2. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2003.

MAYHEW, M.; STEPHENSON, T. Biomass yield reduction: is biochemical manipulation possible without affecting activated sludge process efficiency? **Water Science Technology**, v. 38, n. 8–9, p. 137–144, 1998.

MENDES, A. N.; FILGUEIRAS, L. A.; PINTO, J. C.; NELE, M. Physicochemical Properties of Rhamnolipid Biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to Applications in Microemulsions. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 06, n. 01, p. 64–79, 2015.

METCALF, L.; EDDY, H. **Tratamento de efluentes e recuperação de recursos**. 5. ed. Porto Alegre: AMGH Editora Ltda, 2016.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e padrões: padronização, preparação, purificação, indicadores de segurança e descarte de produtos químicos**. 2. ed. [s.l.] Editora Blucher, 2007.

MURRAY, A.; HORVATH, A.; NELSON, K. L. Hybrid life-cycle environmental and cost inventory of sewage sludge treatment and end-use scenarios: a case study from China. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 9, p. 3163–3169, 2008.

NOVAK, J. T.; CHON, D. H.; CURTIS, B.-A.; DOYLE, M. Biological solids reduction using the Cannibal process. **Water Environment Research**, v. 79, n. 12, p. 2380–2386, 2007.

OLIVEIRA, G.; SCAZUFCA, P.; PIRES, R. C. **Ranking do Saneamento**. São Paulo: Instituto Trata Brasil, 2016.

ORHON, D.; BABUNA, F. G.; KARAHAN, O. **Industrial wastewater treatment by activated sludge**. Londres: IWA Publishing, 2009.

OSMAN, Y. A.; INGRAM, L. O. Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 1, p. 173–180, 1985.

PAL, A.; PAUL, A. K. Optimization of cultural conditions for production of extracellular polymeric substances (EPS) by Serpentine Rhizobacterium *Cupriavidus pauculus* KPS 201. **Journal of Polymers**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

PAOLA, M. DI; LORUSSO, M. Interaction of free fatty acids with mitochondria: coupling, uncoupling and permeability transition. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1757, n. 9–10, p. 1330–1337, 2006.

PASDA, N.; PANICHSAKPATANA, S.; LIMTONG, P.; OLIVER, R.; MONTANGE, D. Evaluation of Bangkok sewage sludge for possible agricultural use. **Waste Management & Research**, v. 24, p. 167–174, 2006.

PAUL, E.; LIU, Y. (EDS.). **Biological sludge minimization and biomaterials/bioenergy recovery technologies**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc, 2012.

PERNEEL, M.; D'HONDT, L.; MAEYER, K. DE; ADIOBO, A.; RABAEY, K.; HÖFTE, M. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 778–788, 2008.

PHAM, T. H.; WEBB, J. S.; REHM, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3405–3413, 2004.

PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1659–1670, 2010.

PLANSAB. **Plano nacional de saneamento básico**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2014.

PODELLA, C. W.; HAUPTMANN, N. S. **Altering metabolism in biological processes** United StatesUSPTO, , 2004.

PODELLA, C. W.; HOOSHNAM, N.; KRASSNER, S. M.; GOLDFELD, M. G. Yeast protein-surfactant complexes uncouple microbial electron transfer and increase transmembrane leak of protons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 140–148, 2009.

POULSEN, T. G.; HANSEN, J. A. Strategic environmental assessment of alternative sewage sludge management scenarios. **Waste Management & Research**, v. 21, n. 1, p. 19–28, 2003.

PUIGAGUT, J.; SALVADÓ, H.; GARCÍA, J. Short-term harmful effects of ammonia nitrogen on activated sludge microfauna. **Water Research**, v. 39, n. 18, p. 4397–4404, 2005.

PUIGAGUT, J.; SALVADÓ, H.; TARRATS, X.; GARCÍA, J. Effects of particulate and soluble substrates on microfauna populations and treatment efficiency in activated sludge systems. **Water Research**, v. 41, n. 14, p. 3168–3176, 2007.

RAZALI, N. M.; WAH, Y. B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. **Journal of Statistical Modeling and Analytics**, v. 2, n. 1, p. 21–33, 2011.

RIKALOVIC, M.; VRVIC, M.; KARADZIC, I. Rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa*: From discovery to application in contemporary technology. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 80, n. 3, p. 279–304, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1. ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

SAINI, G. Metabolic uncoupling: biomass control strategy in microbial processes. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 06, n. 05, 2014.

SÁNCHEZ, M.; ARANDA, F. J.; ESPUNY, M. J.; MARQUÉS, A.; TERUEL, J. A.; MANRESA, Á.; ORTIZ, A. Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted

by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 307, n. 1, p. 246–253, 2007.

SANTA ANNA, L. M. DE M. **Produção e utilização de biossurfactantes na biorremediação de solos impactados com petróleo**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), 2005.

SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; PEREIRA, JR, N.; ALVES, T. L. M.; MENEZES, E. P.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Pseudomonas aeruginosa* PA1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91–93, n. 1–9, p. 459–468, 2001.

SANTANNA JR., G. L. **Tratamento biológico de efluentes: fundamentos e aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2010.

SEN, R. (ED.). Biosurfactants (vol 672). *In: Advances in experimental medicine and biology*. USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, 2010. p. 536.

SHE, Z.; XIE, T.; ZHU, Y.; LI, L.; TANG, G.; HUANG, J. Study on the aerobic biodegradability and degradation kinetics of 3-NP; 2,4-DNP and 2,6-DNP. **Journal of Hazardous Materials**, v. 241–242, p. 478–485, nov. 2012.

SILVEIRA, N. C. DA. **Codigestão do lodo de esgoto e fração orgânica de resíduo de restaurante**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2016.

SNIS. **Diagnóstico dos serviços de água e esgotos - 2014**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2016.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G. (ED.). Biosurfactants: from genes to applications (vol 20). *In: Microbiology Monographs*. Berlin: Springer, 2011. .

SONG, B.; SPRINGER, J. Determination of interfacial tension from the profile of a pendant drop using computer-aided image processing<sup>2</sup>. Experimental. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 184, p. 77–91, 1996.

SPONZA, D. T.; GÖK, O. Effect of rhamnolipid on the aerobic removal of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and COD components from petrochemical wastewater. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 3, p. 914–924, 2010.

STARK, O. **Avoidance of excess sludge by application of surface-active substances - results** Stark Consult, , [s.d.]. Disponível em: <[http://www.stark-consult.com/pdf/avoidance\\_of\\_excess\\_sludge\\_results\\_gb.pdf](http://www.stark-consult.com/pdf/avoidance_of_excess_sludge_results_gb.pdf)>

STARK, O.; KALOS, G. **Reduction of excess sludge by application of surface-active substances - biochemical desintegration** Stark Consult, , [s.d.]. Disponível em: <[http://www.stark-consult.com/pdf/avoidance\\_of\\_excess\\_sludge\\_gb.pdf](http://www.stark-consult.com/pdf/avoidance_of_excess_sludge_gb.pdf)>

SYED-HASSAN, S. S. A.; WANG, Y.; HU, S.; SU, S.; XIANG, J. Thermochemical processing of sewage sludge to energy and fuel: Fundamentals, challenges and considerations. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 80, n. March, p. 888–913, 2017.

TIAN, Y.; ZHANG, J.; WU, D.; LI, Z.; CUI, Y. Distribution variation of a metabolic uncoupler, 2,6-dichlorophenol (2,6-DCP) in long-term sludge culture and their effects on sludge reduction and biological inhibition. **Water Research**, v. 47, n. 1, p. 279–288, jan. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 10. ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2010.

UYSAL, A.; TÜRKMAN, A. Effect of biosurfactant on 2,4-dichlorophenol biodegradation in an activated sludge bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2745–2749, 2005.

VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 389–397, 2017.

VARVARESOU, A.; IAKOVOU, K. Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. **Letters in Applied Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 214–223, 2015.

VÁZQUEZ-RODRÍGUEZ, G. A.; BELTRÁN-HERNÁNDEZ, R. I.; CORONEL-OLIVARES, C.; ROLS, J. L. Standardization of activated sludge for biodegradation tests. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 4, p. 1127–1137, 2011.

VENDRAMEL, S.; BASSIN, J. P.; DEZOTTI, M.; SANT'ANNA, G. L. Treatment of petroleum refinery wastewater containing heavily polluting substances in an aerobic submerged fixed-bed reactor. **Environmental Technology**, v. 36, n. 16, p. 2052–2059, 2015.

VON SPERLING, M. Wastewater characteristics, treatment and disposal (vol 1). In: *Biological Wastewater Treatment Series*. Londres: IWA Publishing, 2007a. p. 296.

\_\_\_\_\_. Activated Sludge and Aerobic Biofilm Reactors (vol 5). In: *Biological Wastewater Treatment Series*. Londres: IWA Publishing, 2007b. p. 336.

VON SPERLING, M.; OLIVEIRA, S. C. Comparative performance evaluation of full-scale anaerobic and aerobic wastewater treatment processes in Brazil. *Water Science and Technology*, v. 59, n. 1, p. 15–22, 2009.

WAKE, H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 62, n. 1–2, p. 131–140, 2005.

WANG, Q.; WEI, W.; GONG, Y.; YU, Q.; LI, Q.; SUN, J.; YUAN, Z. Technologies for reducing sludge production in wastewater treatment plants: State of the art. **Science of the Total Environment**, v. 587–588, p. 510–521, 2017.

WANG, X.; GONG, L.; LIANG, S.; HAN, X.; ZHU, C.; LI, Y. Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Harmful Algae**, v. 4, n. 2, p. 433–443, 2005.

WEI, Y.; HOUTEN, R. T. VAN; BORGER, A. R.; EIKELBOOM, D. H.; FAN, Y. Minimization of excess sludge production for biological wastewater treatment. **Water Research**, v. 37, n. 18, p. 4453–4467, 2003.

WHO; UNICEF. **Progress on drinking water and sanitation - 2014 update**. Luxembourg: WHO, UNICEF, 2014.

WIECKOWSKI, M. R.; WOJTCZAK, L. Fatty acid-induced uncoupling of oxidative phosphorylation is partly due to opening of the mitochondrial permeability transition pore. **FEBS Letters**, v. 423, n. 3, p. 339–342, 1998.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163–175, jan. 2008.

WOJTCZAK, L.; SCHÖNFELD, P. Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1183, n. 1, p. 41–57, 1993.

WYRWAS, B.; KRUSZELNICKA, I.; GINTER-KRAMARCZYK, D. Effect of concentration of an anionic surfactant on the composition of microorganisms in activated sludge. **Przemysł Chemiczny**, v. 90, n. 9, p. 1743–1748, 2011.

XIA, W. J.; ONYUKSEL, H. Mechanistic Studies on Surfactant- Induced Membrane Permeability Enhancement. v. 17, n. 5, p. 612–618, 2000.

YANG, J.; CHEN, X.; YIN, H. Study of inoculum standardization for biodegradation test. **Chinese Journal of Environmental Engineering**, v. 8, n. 5, p. 2146–2152, 2014.

YANG, X.-F.; XIE, M.-L.; LIU, Y. Metabolic uncouplers reduce excess sludge production in an activated sludge process. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1373–1377, abr. 2003.

ZHANG, H.; XIANG, H.; ZHANG, G.; CAO, X.; MENG, Q. Enhanced treatment of waste frying oil in an activated sludge system by addition of crude rhamnolipid solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 167, n. 1–3, p. 217–223, 2009.

ZHANG, Q.; HU, J.; LEE, D. J.; CHANG, Y.; LEE, Y. J. Sludge treatment: current research trends. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1159–1172, 2017.

ZVEIBIL, V. (ED.). **Plano estadual de resíduos sólidos do Rio de Janeiro: relatório de síntese**. Rio de Janeiro: SEA (Secretaria de Estado do Ambiente), 2013. Disponível em: <[http://www.rj.gov.br/c/document\\_library/get\\_file?uuid=65e25795-833b-4eef-acb2-9d29da85b1c6&groupId=132946](http://www.rj.gov.br/c/document_library/get_file?uuid=65e25795-833b-4eef-acb2-9d29da85b1c6&groupId=132946)>.



## Apêndice A – Métodos analíticos e análise de dados

### A.1 Métodos analíticos

#### A.1.1 Produção e caracterização de ramnolipídeos

A concentração de células nos cultivos foi determinada por meio de determinação de absorvância a 600 nm e conversão a peso seco empregando curva-padrão previamente determinada, conforme recomendação de Kronemberger (2007).

A determinação de TS foi realizada em equipamento Krüss DSA100 (Modelo: OF 3210) pelo método de gota pendente (SONG E SPRINGER, 1996), sendo os resultados expressos como média de 10 gotas. A medida de TS da amostra sob diferentes diluições foi empregada no cálculo da CMC, considerada como sendo a concentração correspondente ao ponto central de inflexão da curva de concentração de produto e TS.

A quantificação de ramnose foi realizada por dois métodos: reação com orcinol (adaptado de Pham, Webb e Rehm (2004), sem etapa de extração) e HPLC (coluna HPX-87H da BioRad, 65°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,005 mol/L como fase móvel a 0,6 mL/min e volume de injeção de 20 µL). Para conversão da concentração de ramnose em ramnolipídeos foi utilizado o fator de 44,89 g ramnose/100 g ramnolipídeos (SANTA ANNA, 2005). Como este valor depende da proporção entre os congêneres (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011), a concentração de ramnolipídeos pode não estar correta. Isso é válido principalmente para o produto comercial, já que a cepa utilizada na produção do biossurfactante é diferente. Porém, como as condições de fermentação variaram significativamente na produção de ramnolipídeos em laboratório (item 3), a proporção de congêneres também pode ter variado (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011) e, portanto, o mesmo erro na conversão de ramnose em ramnolipídeos pode ter ocorrido.

#### A.1.2 Carbono

Análises de carbono total (C-total) e carbono inorgânico (C-inorg) foram realizadas em equipamento Shimadzu TOC-VCP<sub>N</sub>, utilizando ar sintético (150 mL/min) como gás de arraste. Por diferença, calculava-se a concentração de C-org. A quantificação de C-total se dava por oxidação catalítica da amostra a 680°C, formando CO<sub>2</sub>, enquanto que na quantificação de

C-inorg, HCl 2 M era adicionado na amostra para reduzir o pH e converter o C-inorg em CO<sub>2</sub>. Em ambos os casos, era feita a detecção não-dispersiva por infravermelho do CO<sub>2</sub> formado. Como a concentração de carbono é proporcional à área gerada, as áreas obtidas com a injeção das amostras eram convertidas em concentrações através de curvas de calibração.

As curvas de calibração eram feitas empregando-se biftalato de potássio como padrão de C-total e mistura de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e NaHCO<sub>3</sub> como padrão de C-inorg. Três curvas de calibração, abrangendo diferentes faixas de concentração, foram realizadas para cada analito: 0 a 20, 20 a 100, e 100 a 1000 mg C/L, sendo utilizadas conforme a concentração de carbono na amostra. Todos os padrões e amostras tinham valores reportados como uma média de pelo menos duas injeções.

Como as amostras analisadas continham biomassa, foi feita uma substituição do diâmetro do tubo de 0,5 mm (padrão do equipamento) para 0,8 mm (kit de sólidos em suspensão). A concentração de biomassa nos experimentos não era elevada e os flocos eram pequenos, minimizando problemas de entupimento. Para melhorar a reprodutibilidade, as amostras eram mantidas sob agitação magnética no momento da análise.

### **A.1.3 Turbidez e D.O.**

No item 4, a turbidez foi determinada em espectrofotômetro Hach (modelo DR-2000, método 750, 450 nm) com cubeta de vidro de 2,5 cm de caminho ótico e a D.O. foi determinada por meio de leitura de absorvância em espectrofotômetro Hach (modelo DR-5000, 590 nm) com cubeta de vidro de 1 cm de caminho ótico, utilizando água destilada como branco. Retirava-se volume apropriado de amostra e, após a leitura, as amostras eram retornadas aos frascos agitados.

### **A.1.4 pH**

O pH das amostras foi determinado por leitura direta em potenciômetro calibrado com soluções tampão de pH 6,86 (ou 7,01), e 4,01 ou 10,01, conforme a faixa de leitura desejada.

### A.1.5 DQO

A determinação de DQO foi realizada pelo método padrão de refluxo fechado, de acordo com o método 5220 D (APHA, 2005). Em um tubo de tampa rosqueada próprio para análise de DQO (Hach), adicionava-se 2 mL de amostra, diluída se necessário. Era feita a adição de 1,2 mL de solução digestora (10,216 g  $K_2Cr_2O_7/L$ , 33,3 g  $HgSO_4/L$  e 167 mL  $H_2SO_4$  concentrado/L, em água) e 2,8 mL de solução catalítica (10,1196 g  $Ag_2SO_4/L$ , em  $H_2SO_4$  concentrado). Os tubos eram homogeneizados e colocados em um bloco digestor, onde as amostras eram digeridas a 150°C por 2 horas. Após resfriamento lento na ausência de luz, eram feitas as leituras de absorvância a 600 nm em espectrofotômetro Hach DR-3900. O branco passava pelo mesmo procedimento, substituindo-se a amostra por água destilada. Para converter o valor de absorvância em DQO, era feita uma curva de calibração (variando de 0 a 1000 mg/L de DQO) com biftalato de potássio como substância padrão (850 mg biftalato/L  $\equiv$  DQO 1000 mg/L). Os tubos de DQO eram utilizados novamente após lavagem com solução sulfocrômica.

Para a quantificação de EPS realizada no item 8, as amostras foram analisadas utilizando-se solução digestora própria para DQO < 100 mg/L (1,022 g  $K_2Cr_2O_7/L$ , 33,3 g  $HgSO_4/L$  e 167 mL  $H_2SO_4$  concentrado/L, em água), conforme recomendado por APHA (2005).

A DQO solúvel foi determinada em amostras centrifugadas (2069 g, 10 min; itens 5 e 6) ou filtradas (membrana de celulose 0,45  $\mu m$ ; itens 7 e 8).

### A.1.6 Sólidos suspensos

A determinação de sólidos suspensos se baseou nos métodos 2540 B, E (APHA, 2005) e era sempre conduzida em duplicata.

Nos itens 7 e 8, foi utilizado o método padrão, sem modificação. O filtro de fibra de vidro (Millipore tipo AP40) era lavado com água destilada e levado à mufla (550°C, 15 min) antes do uso. O cadinho também era levado à mufla (550°C, 1 h) e, após resfriamento em dessecador, o conjunto cadinho + filtro tinha sua massa registrada ( $P_0$ ). A amostra era bem homogeneizada e um volume apropriado ( $V_{amostra}$ ) era então filtrado. Após lavagem com água destilada, o filtro contendo os sólidos suspensos era transferido para o cadinho e o conjunto era levado à estufa (105°C, *overnight*). Após resfriamento em dessecador, o conjunto tinha sua massa registrada ( $P_1$ ) e era levado à mufla (550°C, por 30 min). Após resfriamento em dessecador, o conjunto tinha sua massa registrada ( $P_2$ ).

Nos itens 5 e 6, a determinação de sólidos suspensos do licor misto dos reatores foi realizada com uma modificação: as amostras eram centrifugadas (2069 g, 10 min) ao invés de filtradas. Esta modificação não deve ter influenciado o resultado porque os sólidos de interesse encontravam-se na forma de flocos em suspensão. Os sólidos centrifugados eram lavados com água destilada e centrifugados novamente sob as mesmas condições. O sobrenadante era descartado e os sólidos transferidos para cadinhos previamente tarados.

Os sólidos eram então calculados conforme as Equações (4), (5), e (6):

$$SST (mg/L) = \frac{P_1 - P_0 (g)}{V_{amostra} (mL)} \cdot 10^6 \quad (4)$$

$$SSV (mg/L) = \frac{P_1 - P_2 (g)}{V_{amostra} (mL)} \cdot 10^6 \quad (5)$$

$$SSF = SST - SSV \quad (6)$$

#### A.1.7 Sólidos totais

A determinação de sólidos totais se baseou nos métodos 2540 D, E (APHA, 2005).

O cadinho limpo era levado à mufla (550°C, 1 h) e, após resfriamento em dessecador, tinha sua massa registrada ( $P_0$ ). A amostra era bem homogeneizada e um volume apropriado ( $V_{amostra}$ ) era então adicionado ao cadinho. Após secagem em estufa (105°C, *overnight*) e resfriamento em dessecador, o cadinho tinha sua massa registrada ( $P_1$ ) e era levado à mufla (550°C, por 30 min). Após resfriamento em dessecador, a massa era novamente registrada ( $P_2$ ). Os sólidos eram então calculados conforme as Equações (7), (8), e (9):

$$ST (mg/L) = \frac{P_1 - P_0 (g)}{V_{amostra} (mL)} \cdot 10^6 \quad (7)$$

$$SV (mg/L) = \frac{P_1 - P_2 (g)}{V_{amostra} (mL)} \cdot 10^6 \quad (8)$$

$$SF = ST - SV \quad (9)$$

#### A.1.8 IVL

A determinação do volume de lodo sedimentado se baseou no método 2710 C (APHA, 2005), com algumas modificações. No item 5, 12,5 mL de licor misto eram adicionados em uma proveta de 25 mL (duplicata) e, após 40 min de sedimentação, registrava-se o volume do leito

de lodo. Nos itens 6 e 8, 475 e 500 mL de licor misto eram adicionados, respectivamente, em uma proveta de 500 mL (sem réplica) e, após 30 min, registrava-se o volume do leito de lodo. O resultado era então convertido em mL lodo/L amostra. A determinação do IVL foi feita conforme método 2710 D (APHA, 2005), cujo cálculo se encontra na Equação (10).

$$IVL (mL/g) = \frac{1000 \cdot \text{Lodo sedimentado (mL/L)}}{SST (mg/L)} \quad (10)$$

#### A.1.9 OD

A concentração de OD foi quantificada através de leituras com eletrodo seletivo (Digimed, modelo DM-CO1) acoplado a um medidor (Digimed, modelo DM-4P).

#### A.1.10 Determinação de k

No item 7, a taxa de consumo de substrato, k, foi determinada através da cinética de consumo de DQO solúvel ao longo de 4 h. No Excel, calculou-se uma linha de tendência com ajuste exponencial, cuja expressão está representada na Equação (11), sendo:

- DQO: DQO residual no tempo t (mg/L);
- DQO<sub>0</sub>: DQO inicial, no tempo zero (mg/L);
- k: taxa de consumo de substrato (h<sup>-1</sup>); e
- t: tempo (h).

$$DQO = DQO_0 \cdot e^{-k.t} \quad (11)$$

#### A.1.11 SOUR

O licor misto utilizado na quantificação era transferido para frascos de DBO de 300 mL e aerado com uma vazão de ar elevada, de modo a garantir OD inicial suficiente para permitir visualização do consumo ao longo do tempo. A aeração era, então, interrompida e o substrato era adicionado no frasco. A mistura era mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente (20-22°C), e o OD era registrado a cada 30 s por pelo menos 10 min ou até se atingir 1 mg/L, o que ocorresse primeiro. Os dados eram plotados em um gráfico, obtendo-se a taxa de consumo em mg O<sub>2</sub>/L.min (coeficiente angular da reta traçada através de regressão linear). Relacionando a taxa com a concentração de SST de cada condição, obtinha-se a SOUR em mg O<sub>2</sub>/g SST.min.

Alguns testes conduzidos com volume útil reduzido, quando o frasco de DBO de 300 mL foi substituído por erlenmeyer de 60 mL.

#### **A.1.12 EPS**

A extração térmica de EPS se deu conforme metodologia proposta por (LI E YANG, 2007). O licor misto (50 mL) foi centrifugado (2069 g, 10 min) e o sobrenadante foi descartado. O lodo era então ressuspensionado em 15 mL de solução de NaCl 0,5 g/L à temperatura ambiente, e o volume original (50 mL) era atingido novamente pela adição de solução de NaCl 0,5 g/L aquecida a 70°C. Após levar ao vórtex por 1 min, a suspensão era centrifugada (2069 g, 10 min) novamente. O sobrenadante era chamado de LB-EPS. O lodo era ressuspensionado ao volume original (50 mL) com solução de NaCl 0,5 g/L e a suspensão era aquecida em banho de água a 60°C por 30 min. A suspensão era centrifugada (2069 g, 10 min) novamente e o sobrenadante era chamado de TB-EPS. Analisou-se, então, a DQO solúvel das frações de LB-EPS e TB-EPS. O resultado foi reportado em mg DQO/g SST, já que o licor misto de cada reator apresentava concentrações diferentes de biomassa.

Este método de extração foi escolhido porque LB-EPS e TB-EPS podem apresentar diferentes efeitos nas propriedades superficiais da biomassa, e a maioria dos métodos disponíveis aplicam procedimentos drásticos, que levam à quantificação de EPS total ou apenas de TB-EPS (LI E YANG, 2007).

#### **A.1.13 Resistência específica à filtração e tempo de filtração do lodo**

A resistência específica à filtração ( $r$ ) foi quantificada de acordo com metodologia proposta por Andreoli, von Sperling e Fernandes (2001). Um aparato de filtração com funil de Buchner foi montado, com papel de filtro e proveta para medir o volume filtrado. Com a bomba desligada, 100 mL de amostra de lodo eram adicionados no funil de Buchner e, após a formação da torta, a bomba de vácuo era ligada. Com auxílio de um cronômetro, o volume de filtrado era registrado ao longo do tempo. A filtração era interrompida quando a taxa de coleta de filtrado reduzia para cerca de 1 mL/min. Após a filtração, o teor de sólidos da torta era determinado gravimetricamente em balança de infravermelho (Gehaka, modelo IV2000). Com os dados de tempo ( $t$ , s), volume ( $V$ , mL), e  $t/V$  (s/mL), plotava-se o gráfico  $t/V$  por  $V$  em Excel,

desprezando-se os pontos iniciais e finais. O coeficiente angular da reta traçada na região linear da curva (b) era então utilizado no cálculo de r, de acordo com as Equações (12) e (13). Sendo:

- r: resistência específica à filtração (m/kg);
- P: pressão (N/m<sup>2</sup>);
- $\mu$ : viscosidade absoluta do filtrado (água a 20°C, 10<sup>-3</sup> N.s/m<sup>2</sup>);
- A: área (m<sup>2</sup>);
- b: valor da tangente no trecho retilíneo (s/cm<sup>6</sup>);
- c: massa de sólidos da torta seca por unidade de volume de filtrado (g/mL ou g/cm<sup>3</sup>);
- CL: concentração inicial de sólidos do lodo (%); e
- CT: concentração de sólidos da torta (%).

$$r = \frac{2 \cdot P \cdot A^2 \cdot b}{\mu \cdot c} \quad (12)$$

$$c = \frac{CT \cdot CL}{100 \cdot (CT - CL)} \quad (13)$$

O tempo de filtração é o tempo necessário para coletar 50% do volume de amostra original (APHA, 2005). Sua determinação foi realizada através da mesma análise utilizada para quantificar a resistência específica à filtração. Para amostras com diferentes teores de sólidos, pode-se fazer uma correção grosseira, reportando o resultado em tempo por SST.

## A.2 Análise de dados

### A.2.1 Redução de DQO

A redução de DQO foi calculada e reportada nas tabelas de resultados sem considerar a diluição da alimentação no biorreator e a carga orgânica adicional do produto no biorreator Teste, conforme Equação (14). Foi feito também um balanço de massa para considerar a redução efetiva nos reatores, conforme Equação (15). Sendo:

- $V_{al.}$ : volume de alimentação adicionado na 1ª troca de meio (L);
- $DQO_{al.}$ : DQO da alimentação (mg/L);
- $V_{sob.}$ : volume de sobrenadante que permanece no reator na 1ª troca de meio (L);
- $DQO_s$ : DQO solúvel da amostra retirada após o tempo de reação (mg/L);

- $V_{pr.}$ : volume de produto adicionado no biorreator na 1ª troca de meio (L);
- $DQO_{pr.}$ : DQO do produto adicionado no biorreator (mg/L); e
- $V_{meio}$ : volume de sobrenadante do biorreator (L).

$$Red. DQO (\%) = \frac{DQO_{al.} - DQO_s}{DQO_{al.}} \cdot 100 \quad (14)$$

$$Red. DQO (\%) = \frac{V_{al.} \cdot DQO_{al.} + V_{sob.} \cdot DQO_s + V_{pr.} \cdot DQO_{pr.} - V_{meio} \cdot DQO_s}{V_{al.} \cdot DQO_{al.} + V_{sob.} \cdot DQO_s + V_{pr.} \cdot DQO_{pr.}} \cdot 100 \quad (15)$$

### A.2.2 Descarte de lodo

Nos itens 5, 6, e 8, o descarte de lodo dos biorreatores foi calculado considerando apenas o volume de licor misto retirado diariamente ( $W$ ) e sua concentração de SST, conforme Equação (16). Para volume útil de 500 mL e TRS 20 d,  $W$  era 25 mL/d.

$$Descarte de lodo (mg SST/d) = SST (mg/L) \cdot W (mL/d) \cdot \frac{1}{1000} \quad (16)$$

### A.2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados estatisticamente no *software* Statistica 7.0 (StatSoft) com 90-95% de confiança, reportado junto ao resultado. Já o planejamento de experimentos foi analisado no *software* Protimiza Experimental Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br>) com 90% de confiança.



## Apêndice B – Resultados da operação de RBS de bancada (Operação 2, item 6)

Como anteriormente observado, o efluente sintético prejudicou a sedimentação do lodo, principalmente no biorreator Controle. Neste biorreator, como o volume de lodo era maior que 240 mL, apenas 130 mL de sobrenadante era substituído por nova alimentação nas duas trocas diárias de meio. Para eliminar este problema, a partir do 37º dia de operação o efluente sintético (Tabela 11) foi retirado da composição da alimentação, que passou a consistir apenas de correntes de efluente de refinaria (água ácida e água oleosa) suplementadas com nitrogênio, fósforo, ferro e alumínio, mantendo-se a DQO em valores próximos a 1000 mg/L. A partir do 65º dia, quando o lodo apresentava boas características de sedimentação, a 2ª troca de meio passou a ser feita com 260 mL, conforme proposto na metodologia. Os principais resultados encontram-se na Tabela 30 e Figura 23.

Os valores de IVL (Tabela 30) do biorreator Controle mostram o prejuízo que o efluente sintético trouxe à operação. Dos dias 1 a 36 (com efluente sintético), o IVL apresentou valores de  $250 \pm 37$  mL/g, enquanto dos dias 37 a 64 (sem efluente sintético), os valores reduziram para  $221 \pm 54$  mL/g. Quando o reator voltou às condições normais de operação, com 260 mL de sobrenadante substituído por nova alimentação na 2ª troca de meio, o IVL reduziu para  $173 \pm 16$  mL/g. Daí em diante o efluente sintético não foi mais utilizado como componente da alimentação de todos os biorreatores operados em bateladas sequenciais.

A sedimentação do lodo do biorreator Teste foi melhor que no Controle (IVL  $135 \pm 92$  e  $250 \pm 48$  mL/g, respectivamente). Assim como no item 5, a adição de biossurfactante reduziu em aproximadamente 40% o valor do IVL. Desta forma, pode-se supor que sua adição melhorou a sedimentação do lodo, principalmente porque, novamente, não foi observado aumento na turbidez do efluente (análise visual, tendo em vista que não foram realizadas análises de turbidez e de sólidos suspensos no efluente retirado ao final das bateladas para comprovar).

Ainda no Período 1, a redução de DQO no biorreator Teste foi mais baixa ( $90,6 \pm 2,5$  % no Controle e  $83,1 \pm 8,2$  % no Teste). Calculando a eficiência com base no balanço de massa e levando em consideração a matéria orgânica oriunda do produto adicionado (Equação (15)), as remoções seriam 83% e 82% no Controle e no Teste, respectivamente, valores bastante próximos. Contudo, a concentração de sólidos no biorreator Teste chegou a 472 mg SST/L, valor que pode ter sido insuficiente para consumir toda a matéria orgânica. Existe uma correlação de 70% entre a concentração de SST no sistema e a redução de DQO observada no

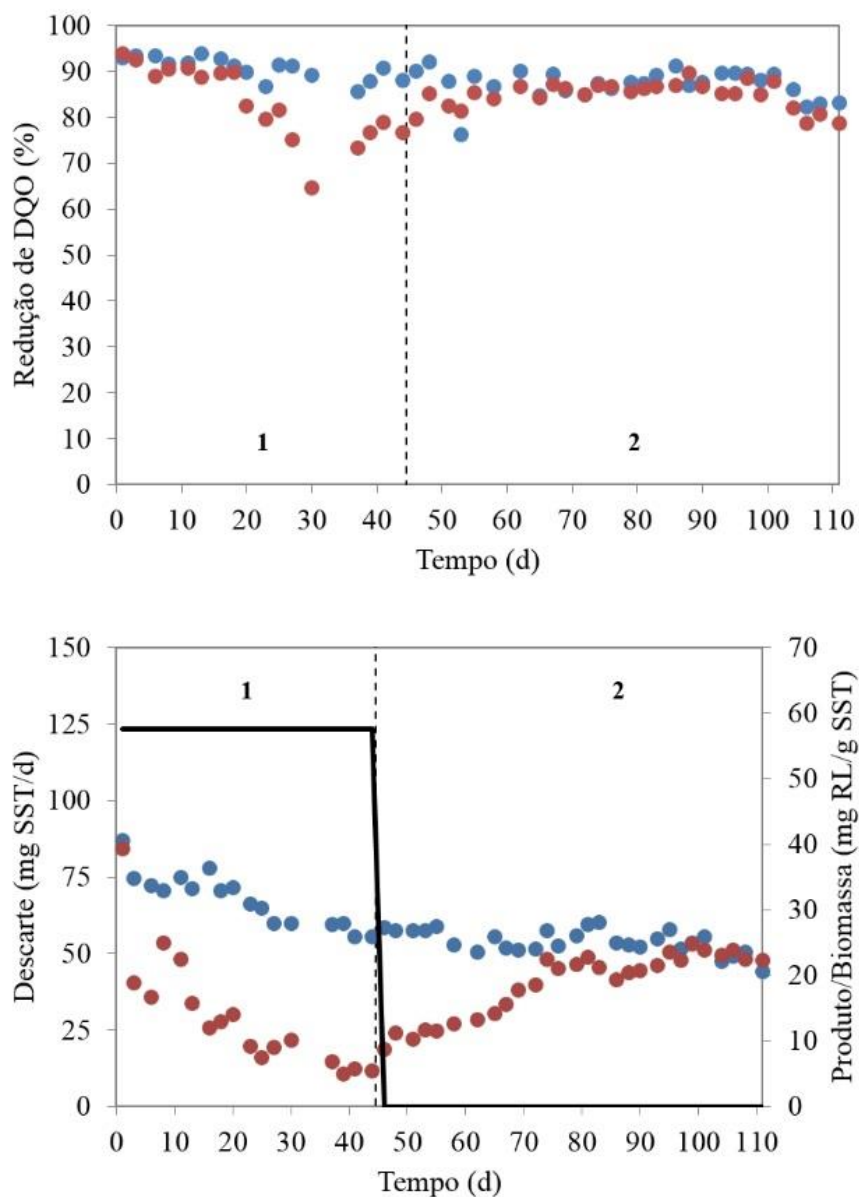
biorreator Teste (Figura 24). Portanto, pode-se concluir que este lote de produto não prejudicou diretamente a eficiência do tratamento.

Tabela 30 – Adição de 50 mg RL/L em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo.

Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 44) <sup>(a)</sup>	Período 2 (45 a 111)
Tempo (d)		44	67
n <sup>(b)</sup>		11 a 17	27 a 28
[Produto] no reator (mg RL/L)	Teste	50	0
Lote de produto (Tabela 2)	Teste	6	—
DQO alimentação (mg/L)	Controle	1113 ± 189	932 ± 69
	Teste		
DQO saída <sup>(c)</sup> (mg/L)	Controle	101 ± 17	119 ± 30
	Teste	175 ± 62*	141 ± 27*
Redução de DQO(%)	Controle	90,6 ± 2,5	87,1 ± 3,3
	Teste	83,1 ± 8,2*	84,8 ± 2,9*
pH alimentação	Controle	7,4 ± 0,1	7,4 ± 0,1
	Teste		
pH saída <sup>(c)</sup>	Controle	7,7 ± 0,6	6,9 ± 0,5
	Teste	7,9 ± 0,3	7,7 ± 0,5*
SST (mg/L)	Controle	2709 ± 345	2159 ± 156
	Teste	1189 ± 757*	1598 ± 425*
SSV (mg/L)	Controle	2148 ± 162	1783 ± 124
	Teste	1000 ± 538*	1335 ± 369*
SSV/SST	Controle	0,80 ± 0,05	0,83 ± 0,03
	Teste	0,87 ± 0,08*	0,83 ± 0,04
IVL (mL/g)	Controle	250 ± 48	181 ± 24
	Teste	135 ± 92*	137 ± 32*
Produto/Biomassa (mg RL/g SST)	Teste	58 ± 31	0
Descarte de lodo(mg SST/d)	Controle	68 ± 9	54 ± 4
	Teste	30 ± 19*	40 ± 11*
Redução no descarte (%)	Teste	56*	—

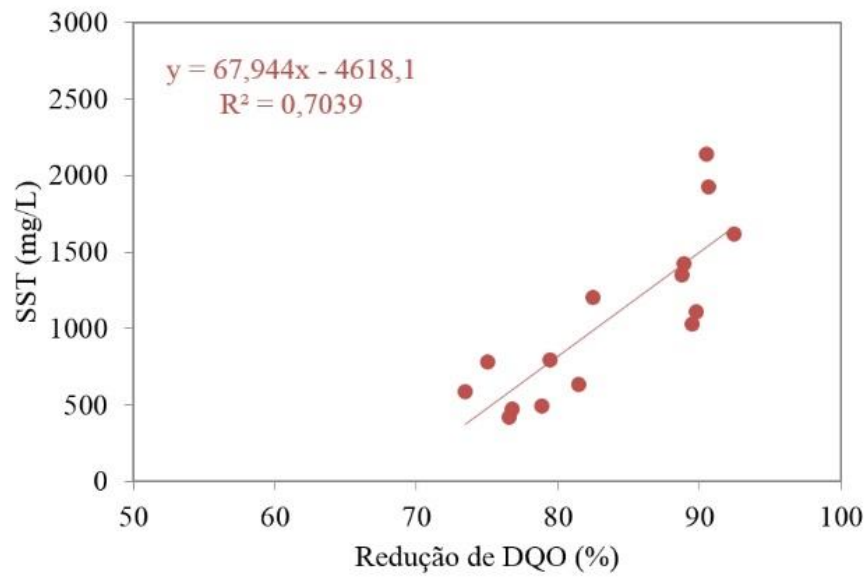
Fonte: elaboração própria. Operação: TRH 5,5 h, TRS 20 d. <sup>(a)</sup>Tempo de operação no período, em dias. <sup>(b)</sup>Número de amostras no período. <sup>(c)</sup>Amostra de licor misto centrifugada (2069 g, 10 min). \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).

Figura 23 – Adição de 50 mg RL/L em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo.



Fonte: elaboração própria. Pontos azuis (●) representam dados do biorreator Controle e pontos vermelhos (●) dados do biorreator Teste. A linha cheia (—) representa os valores médios da relação produto/biomassa de cada período. Linhas pontilhadas (----) na vertical representam diferentes períodos de operação. Período 1: 50 mg RL/L (lote 6). Período 2: sem adição de biossurfactante.

Figura 24 – Relação entre concentração de SST e redução de DQO em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo.



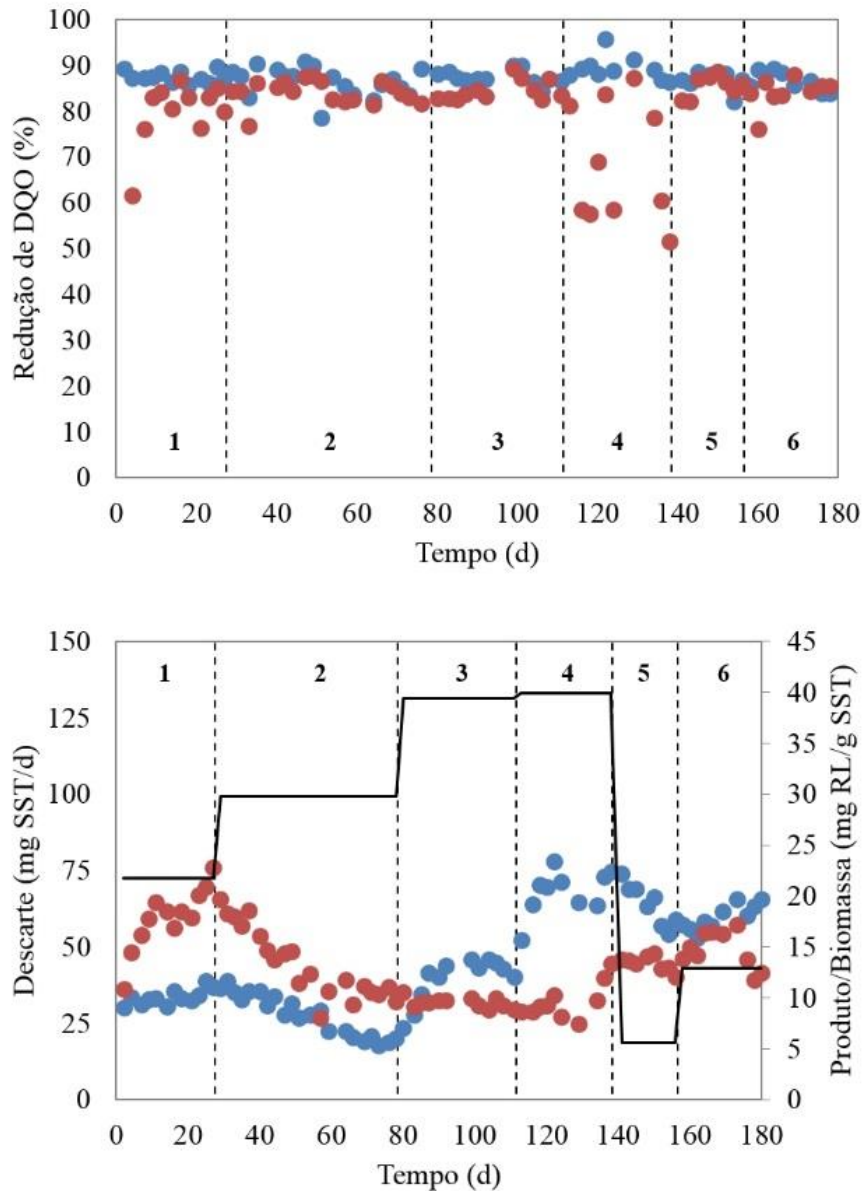
Fonte: elaboração própria.

### **Apêndice C – Resultados da operação de RBS de bancada (Operação 3, item 6)**

A operação dos biorreatores foi dividida em 6 períodos, com diferenças no TRH, na concentração de biossurfactante e na adição ou não de glicose no biorreator Controle, de modo a compensar a carga orgânica adicional do biossurfactante no biorreator Teste. Os principais resultados encontram-se na Figura 25 e Tabela 31.

No Período 1, a adição de 50 mg RL/L no biorreator Teste aparentemente causou prejuízo na redução de DQO ( $87,6 \pm 1,3\%$  no Controle e  $80,0 \pm 6,9\%$  no Teste). Entretanto, considerando a DQO do biossurfactante no cálculo da eficiência (Equação (15)), obtém-se 78% para o Controle e 83% para o Teste. Desta forma, o biossurfactante não reduziu a eficiência do sistema, porém a DQO final do biorreator foi maior que no Controle. No Período 4, contudo, a redução de DQO no biorreator Teste foi muito prejudicada ( $89,3 \pm 2,6\%$  no Controle e  $68,7 \pm 13,0\%$  no Teste). A redução da aeração para controle da espuma levou a concentração de oxigênio dissolvido a níveis insuficientes para manutenção do metabolismo aeróbio, observando-se valores de até 0 mg O<sub>2</sub>/L. Deste modo, a redução no descarte de lodo pode não ter sido em decorrência da adição do biossurfactante, e sim de uma cinética de degradação de substrato mais lenta, reduzindo o coeficiente de rendimento celular.

Figura 25 – Efeito do ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bateladas sequenciais de bancada sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo.



Fonte: elaboração própria. Pontos azuis (•) representam dados do biorreator Controle e pontos vermelhos (•) dados do biorreator Teste. A linha cheia (—) representa os valores médios da relação produto/biomassa de cada período. Linhas pontilhadas (---) na vertical representam diferentes períodos de operação. Período 1: 50 mg RL/L (lote 7), TRH 5,5 h, sem adição de glicose no Controle. Período 2: 50 mg RL/L (lote 7), TRH 24 h, sem adição de glicose no Controle. Período 3: 50 mg RL/L (lote 7), TRH 24 h, com adição de glicose no Controle. Período 4: 50 mg RL/L (lote 7), TRH 5,5 h, com adição de glicose no Controle. Período 5: 10 mg RL/L (lote 7), TRH 5,5 h, com adição de glicose no Controle. Período 6: 25 mg RL/L (lote 7), TRH 5,5 h, com adição de glicose no Controle.

Tabela 31 – Efeito do ramnolípídeo em sistema de lodos ativados bateladas sequenciais de bancada operando sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo.

Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 27) <sup>(a)</sup>	Período 2 (28 a 78)	Período 3 (79 a 111)	Período 4 (112 a 138)	Período 5 (139 a 156)	Período 6 (157 a 180)
Tempo (d)		27	51	33	27	18	24
TRH (h)		5,5	24	24	5,5	5,5	5,5
n <sup>(b)</sup>		11 (5)	19 (5)	12 (2)	10 (6)	8 (4)	9 (2)
[Produto] no reator (mg RL/L)	Teste	50	50	50	50	10	25
Lote de produto (Tabela 2)	Teste	7	7	7	7	7	7
[Glicose] no reator (mg/L)	Controle	0	0	228	228	46	114
DQO alimentação (mg/L)	Controle	878±53	804±52	776±127	951±50	930±56	1032±95
	Teste						
DQO saída <sup>(c)</sup> (mg/L)	Controle	109±11	108±22	97±14	101±25	121±13	138±28
	Teste	176±67*	128±21*	118±13*	296±121*	131±16	164±35
Redução de DQO (%)	Controle	87,6±1,3	86,5±3,2	87,4±1,5	89,3±2,6	86,9±2,1	86,7±2,1
	Teste	80,0±6,9*	84,1±2,7*	84,5±2,2*	68,7±13,0*	85,5±2,3	84,1±3,3
pH alimentação	Controle	6,6±0,1	6,8±0,3	6,7±0,2	6,7±0,2	6,7±0,1	6,5±0,2
	Teste						
pH saída <sup>(c)</sup>	Controle	8,2±0,1	8,1±0,4	8,2±0,5	8,0±0,3	8,7±0,5	7,9±0,4
	Teste	8,0±0,1*	8,0±0,5	8,1±0,3	7,6±0,2*	8,3±0,8	7,8±0,3
SST (mg/L)	Controle	1343±104	1114±275	1584±288	2725±293	2561±270	2391±170
	Teste	2381±412*	1789±460*	1272±68*	1290±239*	1787±98*	1968±245*
SSV (mg/L)	Controle	1174±126	990±280	1449±249	2546±277	2341±228	2240±173
	Teste	2128±410*	1641±427*	1161±69*	1206±232*	1662±130*	1838±211*
SSV/SST	Controle	0,87±0,04	0,88±0,11	0,92±0,03	0,93±0,02	0,92±0,04	0,94±0,02
	Teste	0,89±0,03	0,92±0,03	0,91±0,02	0,93±0,04	0,93±0,03	0,94±0,02
IVL (mL/g)	Controle	50±5	43±10	57±19	92±27	78±12	78±1
	Teste	53±10	60±11*	32±22	50±22*	106±9*	69±1*

Tabela 31 – Efeito do ramnolípídeo em sistema de lodos ativados bateladas sequenciais de bancada operando sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo (cont).

Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 27) <sup>(a)</sup>	Período 2 (28 a 78)	Período 3 (79 a 111)	Período 4 (112 a 138)	Período 5 (139 a 156)	Período 6 (157 a 180)
Produto/Biomassa (mg RL/g SST)	Teste	22±4,7	30±7,6	39±2,1	40±6,6	5,6±0,32	13±1,7
Descarte de lodo (mg SST/d)	Controle	34±3	28±7	40±7	68±7	64±7	60±4
	Teste	60±10*	45±12*	32±2*	32±6*	45±2*	49±6*
Redução no descarte (%)	Teste	-77*	-61*	20*	53*	30*	18*

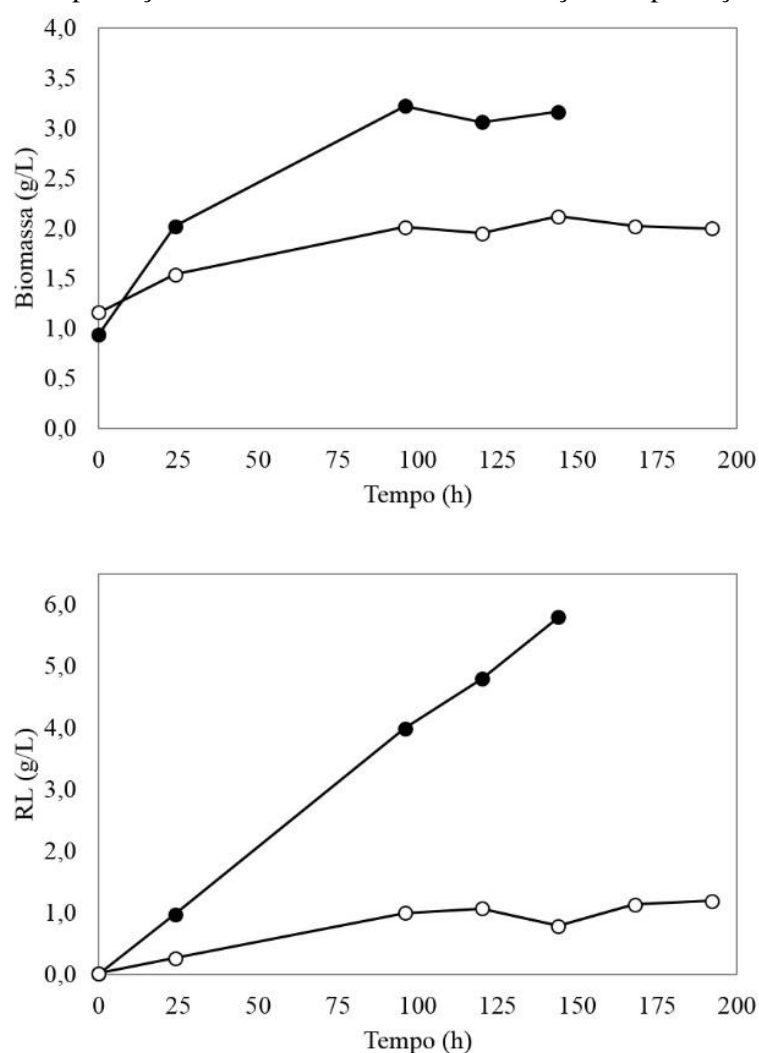
Fonte: elaboração própria. Operação: TRH 5,5 h (reciclo 1) ou TRH 24 h (sem reciclo), TRS 20 d. <sup>(a)</sup>Tempo de operação no período, em dias. <sup>(b)</sup>Número de pontos do período. Valores entre parênteses correspondem ao IVL. <sup>(c)</sup>Amostra de licor misto centrifugada (2069 g, 10 min). \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).



### Apêndice D – Resultados da operação de RBS de bancada (Operação 4, item 6)

Nesta etapa, o efeito de dois lotes de biossurfactante do tipo ramnolípido produzido em laboratório foi avaliado. Ambos os lotes foram produzidos simultaneamente, um em frascos agitados (lote 10) e outro em fermentador de bancada (lote 11). Na produção de RL em fermentador, houve problemas na aeração do sistema, fazendo com que as cinéticas de produção fossem diferentes, conforme apresentado na Figura 26.

Figura 26 – Cinética de produção de biomassa e RL nas fermentações de produção dos lotes 10 e 11.



Fonte: elaboração própria. Pontos cheios (●) representam dados obtidos em frascos agitados com o lote 10 e pontos vazados (○), dados obtidos em fermentador de bancada com o lote 11.

Após a partida dos 3 biorreatores, nenhum produto foi adicionado por 34 dias. Este período de adaptação foi suficiente para atingir estabilidade na redução de DQO e na concentração de sólidos em todos os biorreatores (Controle, Teste<sup>lote10</sup> e Teste<sup>lote11</sup>). Após esse tempo, os

biorreatores Teste tiveram adição intermitente de 50 mg RL/L por 10 dias. A formação de espuma era muito intensa, mesmo com aeração reduzida. Com isso, a redução de DQO nos biorreatores Teste atingiu valores tão baixos quanto 18%.

Conforme mencionado no item 6.3, a mudança no método de quantificação de ramnose é um fator importante a ser considerado. Como a quantificação dos lotes 10 e 11 foi feita por HPLC, a concentração de 50 mg RL/L provavelmente era maior que a necessária para a reprodução dos resultados obtidos no item 5. Por isso, foram avaliados 2 períodos de operação, com adição de 10 e 25 mg RL/L, mantendo-se todas as outras condições de operação (alimentação com efluente real, TRH 5,5 h, duas trocas diárias de meio, e TRS 20 d).

O período de adição intermitente de RL alterou a concentração de biomassa nos sistemas. No 1º dia de operação do período de interesse (10 mg RL/L), as concentrações de SST no Controle, Teste<sup>lote10</sup> e Teste<sup>lote11</sup> eram, respectivamente, 2272, 1684 e 1656 mg/L. Ou seja, os biorreatores Teste partiram de concentrações 25-27% mais baixas que o Controle. Para que a análise pudesse ser feita diretamente pela concentração de SST e pelo descarte de lodo, sem ter que considerar as taxas de crescimento da biomassa em cada reator, os valores de SST foram modificados para partir do mesmo valor que o Controle (2272 mg SST/L). Os principais resultados desta operação encontram-se na Figura 27 e Tabela 32.

Apesar de o teste t indicar prejuízo na redução de DQO no Período 2, quando se calcula a eficiência considerando a DQO do produto adicionado (Equação (15)), tal prejuízo não é observado. No Período 1, tem-se 51,5% de eficiência de remoção de DQO para o Controle e 63,5% para o Teste<sup>lote11</sup>. Já no Período 2, tem-se 53,0% para o Controle, 58,0% para o Teste<sup>lote10</sup>, e 74,6% para o Teste<sup>lote11</sup>. Desta forma, o produto também não reduziu a eficiência do sistema, apesar de a DQO final nos reatores Teste ter sido maior que no Controle.

Ambos os lotes de produto avaliados nessa etapa induziram o descarte de lodo, com valores até 85% maiores que no Controle. Isso pode ter ocorrido devido às diferenças observadas nas fermentações de produção do biossurfactante, conforme apresentado no item 3. Tanto que no Período 2 a adição de 25 mg RL/L de diferentes lotes, levou a resultados bem distintos. Além da formação de diferentes proporções de congêneres, como o produto não foi purificado, a matéria orgânica residual também pode ter influenciado os resultados obtidos.

Figura 27 – Efeito do ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bateladas sequenciais de bancada sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo.

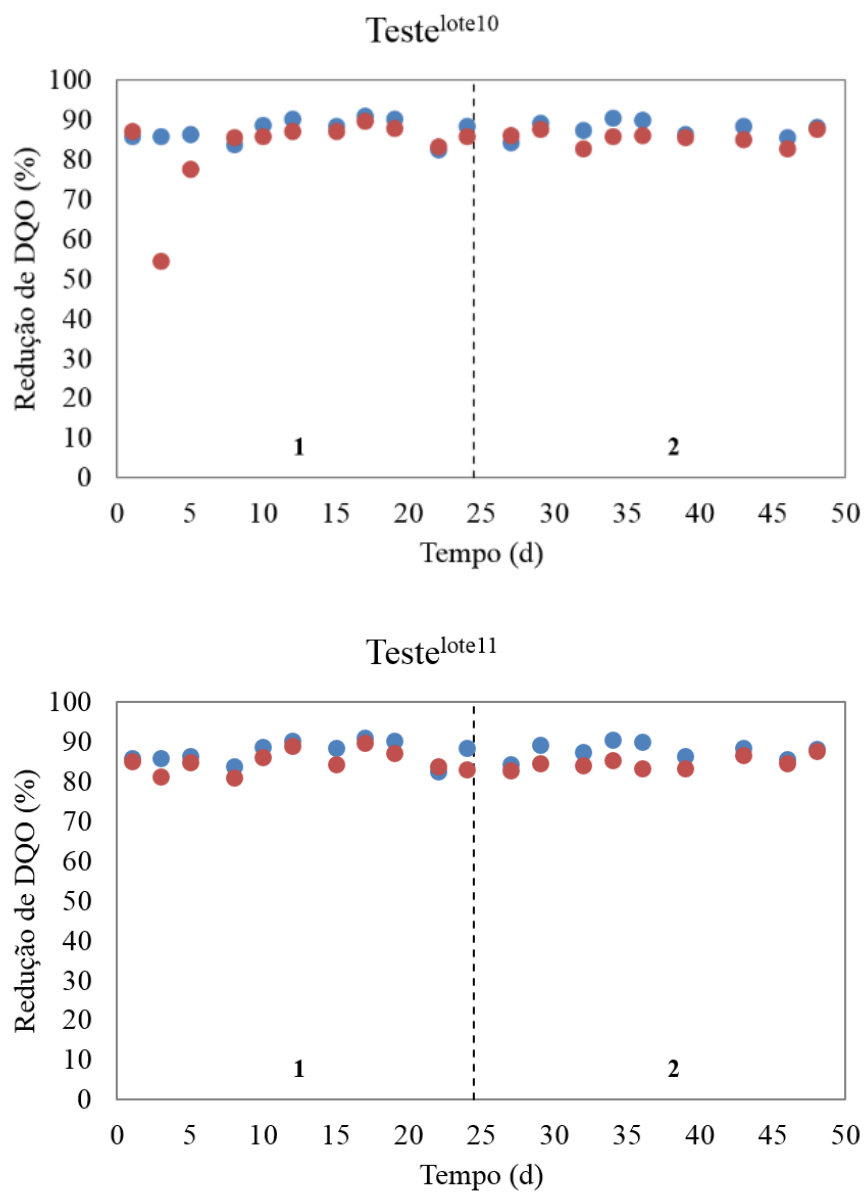
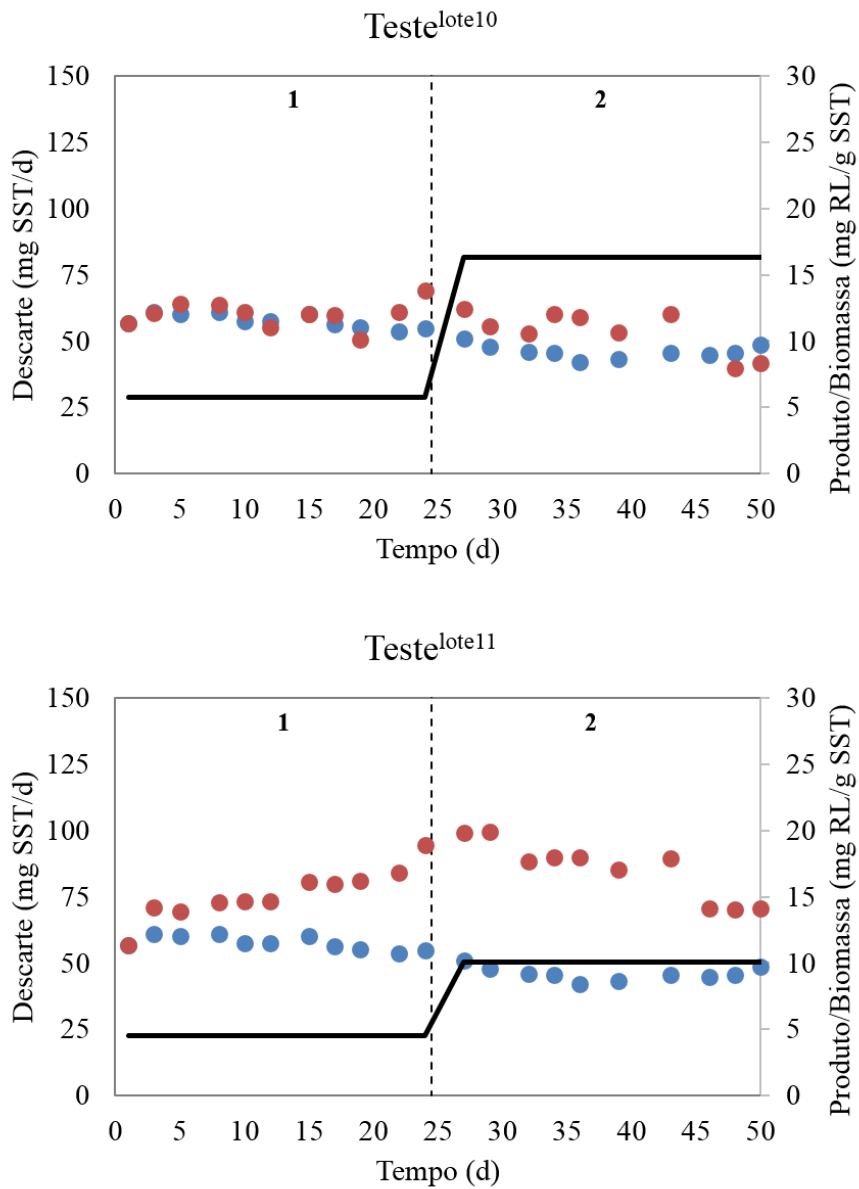


Figura 27 – Efeito do ramnolípídeo em sistema de lodos ativados de bateladas sequenciais de bancada sob diferentes condições de operação com efluente de refinaria de petróleo (cont.).



Fonte: elaboração própria. Pontos azuis (•) representam dados do biorreator Controle e pontos vermelhos (•), dados dos biorreatores Teste. A linha cheia (—) representa os valores médios da relação produto/biomassa de cada período. Linhas pontilhadas (----) na vertical representam diferentes períodos de operação, baseados em mg RL/L. Período 1: 10 mg RL/L. Período 2: 25 mg RL/L.

Tabela 32 – Adição de RL em sistema de lodos ativados de bancada operando em bateladas sequenciais com efluente de refinaria de petróleo.

Parâmetro	Condição	Período 1 (1 a 24) <sup>(a)</sup>	Período 2 (25 a 50)
Tempo (d)		24	26
n <sup>(b)</sup>		11 (5)	10 (2)
[Produto] no reator (mg RL/L)	Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	10	25
Lote de produto (Tabela 2)	Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	10 11	10 11
DQO alimentação (mg/L)	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	936 ± 42	1032 ± 95
DQO saída <sup>(c)</sup> (mg/L)	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	118 ± 23 161 ± 96 140 ± 25*	126 ± 20 150 ± 26* 157 ± 13*
Redução de DQO(%)	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	87,4 ± 2,8 82,9 ± 10,0 85,0 ± 2,8	87,7 ± 2,0 85,5 ± 1,8* 84,7 ± 1,6*
pH alimentação	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	6,7 ± 0,1	6,5 ± 0,2
pH saída <sup>(c)</sup>	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	8,3 ± 0,6 8,3 ± 0,6 8,1 ± 0,5	8,0 ± 0,5 7,7 ± 0,5 7,5 ± 0,5
SST <sup>(d)</sup> (mg/L)	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	2305 ± 101 2406 ± 195 3040 ± 385*	1842 ± 105 2154 ± 327* 3411 ± 444*
SSV <sup>(d)</sup> (mg/L)	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	1969 ± 80 2063 ± 206 2685 ± 428*	1666 ± 97 1998 ± 309* 3127 ± 401*
SSV/SST	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	0,85 ± 0,03 0,86 ± 0,03 0,88 ± 0,04	0,90 ± 0,03 0,93 ± 0,02 0,92 ± 0,02
IVL (mL/g)	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	106 ± 17 90 ± 32 94 ± 7	91 ± 3 50 ± 1* 64 ± 6*
Produto/Biomassa (mg RL/g SST)	Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	5,7 ± 0,5 4,5 ± 0,6	16 ± 2,9 10 ± 1,4
Descarte de lodo <sup>(d)</sup> (mg SST/d)	Controle Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	58 ± 3 60 ± 5 76 ± 10*	46 ± 3 54 ± 8* 85 ± 11*
Redução no descarte (%)	Teste <sup>lote10</sup> Teste <sup>lote11</sup>	-4 -32*	-17* -85*

Fonte: elaboração própria. Operação: TRH 5,5 h, TRS 20 d. <sup>(a)</sup>Tempo de operação no período, em dias. <sup>(b)</sup>Número de pontos no período. Valores entre parênteses correspondem ao IVL. <sup>(c)</sup>Amostra de licor misto centrifugada (2069 g, 10 min). <sup>(d)</sup>Valores dos Testes foram modificados para que partissem do mesmo valor inicial de SST que o Controle. \*Valores estatisticamente diferentes do Controle (teste t,  $\alpha$  0,05).