

# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

## **BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO MINERAL POR BACTÉRIAS AUTÓCTONES DE FLUIDO DE CORTE**

**Danielle Hiromi Nakagawa<sup>(1)</sup>; Ana Alícia de Sá Pinto<sup>(2)</sup>; Gabriella de Ornelas Menezes<sup>(3)</sup>; Francylli Pereira Silva<sup>(4)</sup>; Fábio de Sousa Santos<sup>(5)</sup>; Isabel Craveiro Moreira<sup>(6)</sup>; Kátia Valéria Marques Cardoso Prates<sup>(7)</sup>; Janaina Fracaro de Souza Gonçalves<sup>(8)</sup>**

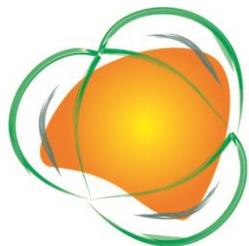
<sup>(1)</sup> Docente; Instituto Federal do Paraná – Campus Jaguariaíva; Jaguariaíva-PR; danielle.nakagawa@ifpr.edu.br; <sup>(2)</sup> Mestranda; Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídrico; Universidade de Brasília; Brasília-DF; analicia2@gmail.com em; <sup>(3)</sup> Graduanda; Engenharia Ambiental; Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Campus Londrina; gabriella.ornelas@gmail.com; <sup>(4)</sup> Graduanda; Licenciatura em Química; UTFPR – Campus Londrina; francylli.pereirasilva@hotmail.com; <sup>(5)</sup> Mestre; Engenharia Mecânica; UTFPR – Campus Cornélio Procopio; fabiosousa2691@hotmail.com; <sup>(6)</sup> Docente; Departamento Acadêmico de Química; UTFPR – Campus Londrina; icmoreira@utfpr.edu.br; <sup>(7)</sup> Docente; Departamento Acadêmico de Ambiental; UTFPR – Campus Londrina; kprates@utfpr.edu.br <sup>(8)</sup> Docente; Coordenação de Engenharia Mecânica; UTFPR – Campus Londrina; janainaf@utfpr.edu.br.

**Eixo Temático:** 7. Gerenciamento de Resíduos Sólidos e Líquidos

**RESUMO** – Os fluidos de corte são amplamente utilizados nos processos de usinagem, porém no momento do descarte este se torna um efluente complexo para ser tratado em função da sua composição química. Geralmente estes efluentes são tratados por processos físico-químicos, por isso estudos alternativos utilizando microrganismos são desejáveis, pois podem contribuir para o aumento da eficiência do tratamento. Desse modo, o objetivo do trabalho foi isolar e selecionar bactérias autóctones de fluido de corte a base de óleo mineral e verificar a capacidade de degradar o óleo mineral, com o propósito futuro de utilizar esses microrganismos no tratamento biológico deste fluido. As bactérias foram isoladas do fluido de corte a base de óleo mineral utilizado em uma máquina ferramenta. Para o isolamento das bactérias presente no fluido de corte, utilizou-se o meio de cultivo Plate Count Agar – PCA. Os microrganismos isolados foram submetidos ao teste de capacidade de degradação de hidrocarbonetos avaliados por 5 dias utilizando o composto 2,6-diclorofenol-indofenol como indicador. Foram isoladas 35 colônias de bactérias, sendo que 69% não foi capaz de degradar o óleo mineral e 3% degradou em 1 dia, 6% degradou em 2 e 3 dias e 17% em 5 dias.

**Palavras-chave:** 2,6-diclorofenol-indofenol. Tratamento biológico. Efluente. Óleo mineral.

**Abstract:** Cutting fluids are widely used in machining processes. However, at the moment of disposal it becomes a complex effluent to be treated because of its chemical composition. Usually this kind of effluent is treated by chemical-physical processes, for this reason, alternative studies using microorganisms are desirable because they can



# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

contribute to the increase of treatment efficiency. The aim of this study was to isolate and select autochthonous bacteria from cutting fluid on mineral oil bases, with the future purpose of using these microorganisms on biological treatment of this fluid. Bacteria were isolated from the cutting fluid on mineral oil basis used in tool machine. To isolate the bacteria, the Plate Count Agar – PCA, was used as culture media. The isolated microorganisms were submitted to hydrocarbons degradation capacity test for 5 days using the compound 2,6 – di-chlorophenol-indophenol as indicator. 35 bacteria colonies were isolated, in which 69% were not able to degrade the mineral oil and 3% degraded it in 1 day, 6% degraded it in 2 or 3 days and 17% in 5 days.

**Keywords:** 2,6 – di-chlorophenol-indophenol. Biological treatment . Effluent. Mineral oil.

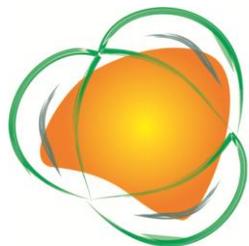
## **Introdução**

O setor metalúrgico apresenta expressiva importância no cenário econômico brasileiro, com ampla cadeia produtiva dos segmentos ligados à metalurgia, usinagem e produção de manufaturados metálicos (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO SETOR METALÚRGICO, 2014). Nos processos de usinagem há o contato entre a ferramenta de corte com a peça usinada, porém, a ferramenta aquece dando lugar ao abrandamento do material de que é constituída, ao desgaste prematuro da ferramenta de corte e ainda à sua ruptura (RABELLO, BINI, 2005).

Para atenuar os problemas relacionados com a peça, geralmente são empregados fluidos lubrificantes, conhecidos como fluidos de corte (RABELLO, BINI, 2005). Desse modo, o fluido de corte é amplamente utilizado nos processos de usinagem, pois fornece lubrificação; resfria a interface da ferramenta-peça; reduz o desgaste da ferramenta; retira os resíduos de metal que ficam presos à peça obstruindo a visão do trabalhador; e facilita a finalização da superfície das peças metálicas (MATTSBY-BALTZER et al., 1989; BYERS, 2006, KOCH; PASSMAN; RABENSTEINS, 2015).

Os fluidos de corte são constituídos de óleo, pois estes possuem alto poder lubrificante, podendo assim reduzir a geração de calor devido ao atrito entre ferramenta-peça e cavaco-ferramenta e assegurar um melhor acabamento superficial à peça. Desse modo, são utilizados dois principais tipos de fluido de corte: os óleos integrais e os óleos emulsionáveis (1 a 20% de óleo). A escolha do fluido de corte a ser utilizado depende de fatores como: material da peça, condições de usinagem, material da ferramenta e operações de usinagem (DINIZ; MARCONDES; COPPINI, 1999).

Em 2009, cerca de 39 milhões de toneladas de lubrificantes foram utilizadas em máquinas-ferramentas ao redor do planeta, e a estimativa de crescimento até 2019 é de 1,2 % (PUSAVEC; KRAJNIK; KOPAC, 2010). Deste montante, é estimado que 85% seja composto por óleo à base de petróleo (óleo mineral). No entanto, os óleos minerais representam uma ameaça ao ambiente quando descartados por sua inerente



# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

toxicidade e baixa biodegradabilidade (PUSAVEC; KRAJNIK; KOPAC, 2010; WICHMANN, et al. 2013; CHETAN; GHOSH; RAO, 2015).

A complexidade da composição dos efluentes gerados na indústria de usinagem criam dificuldades para o seu tratamento. Geralmente estes efluentes são tratados por processos físico-químicos, por isso estudos alternativos utilizando microrganismos são desejáveis, pois podem contribuir para o aumento da eficiência do tratamento do efluente (QUEISSADA; SILVA; PAIVA, 2011).

Desse modo, um método interessante para tratamento de efluente por microrganismos é a bioaugmentação, que é um sistema de tratamento biológico que visa a utilização de microrganismos autóctones do próprio efluente para o tratamento de efluentes. Para o sucesso do tratamento por bioaugmentação são necessárias duas características fundamentais: os microrganismos serem capazes de degradar os componentes químicos do efluente e serem capazes de sobreviver e se desenvolver no efluente. Sendo que uma das vantagens de isolar os microrganismos autóctones do fluido de corte é a seleção de espécies que sobrevivam na existência de biocidas do fluido de corte, pois não serão inativados no tratamento (VAN DER GAST; THOMPSON, 2004).

Diante disso, o objetivo do trabalho foi isolar e selecionar bactérias autóctones de fluido de corte a base de óleo mineral e verificar a capacidade de degradar o óleo mineral, com o propósito futuro de utilizar esses microrganismos no tratamento biológico deste fluido.

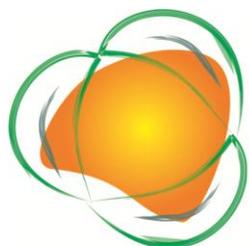
## **Material e Métodos**

Para a execução deste trabalho as bactérias foram isoladas do fluido de corte a base de óleo mineral utilizado em uma máquina ferramenta ROMI D-600 Standard com reservatório de capacidade de armazenamento de 300 L. Foram realizadas 6 coletas de fluido de corte no período de dois meses de uso da máquina.

Para o isolamento das bactérias presente no fluido de corte, utilizou-se o meio de cultivo Plate Count Agar - PCA (Merk) incubadas por 24 h a 37°C. Após o crescimento das colônias, estas foram isoladas pela técnica de esgotamento em placas de Petri com o mesmo tipo de meio de cultura. Em cada coleta foram isoladas as colônias que possuíam características diferentes.

Após a obtenção das colônias isoladas, estas foram submetidas a testes morfotintoriais para identificação da coloração de Gram e morfologia dos microrganismos.

Os microrganismos isolados foram submetidos ao teste de capacidade de degradação de hidrocarbonetos proposto por Hanson et al (1993, com modificações). A metodologia consiste em inocular o microrganismo de interesse em meio Bushnel Haas (BH) composto por 1g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0,2 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g/L de  $\text{FeCl}_3$  e 0,02g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  com adição de solução de



# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS  
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) em concentração 1 g/L juntamente com uma fonte de carbono (nesta pesquisa - óleo mineral utilizado para formulação do fluido de corte).

Para realização do teste, o inóculo foi padronizado comparando com a turbidez do padrão 0,5 da escala McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) (Miranda et al. 2007). Os testes foram realizados em placas de acrílico (tipo ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent*) com 96 poços previamente esterilizados, onde o volume final utilizado foi de 150  $\mu$ L (8  $\mu$ L de solução de microrganismos padronizado, 138,6  $\mu$ L de meio BH, 1,4  $\mu$ L de DCPIP e 2  $\mu$ L da fonte de carbono). A degradação do óleo foi analisada por meio da mudança de coloração de azul para incolor. O DCPIP é um composto químico que altera a coloração de azul escuro para transparente quando reduzido. Desse modo, ao incorporar o DCPIP ao meio de cultura é possível avaliar a capacidade dos microrganismos em utilizar o hidrocarboneto como substrato pela observação da mudança de cor (Bidoia et al., 2010).

Foram feitos dois controles negativos sendo um com 8  $\mu$ L de água estéril, 138,6  $\mu$ L de meio BH, 1,4  $\mu$ L de DCPIP e 2  $\mu$ L da fonte de carbono (Controle 1, com o objetivo de avaliar a esterilidade do óleo) e outro com 10  $\mu$ L de água estéril, 138,6  $\mu$ L de meio BH, 1,4  $\mu$ L de DCPIP (Controle 2, para confirmar a esterilidade do meio de cultivo). O teste foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por um período de 5 dias, sendo realizada uma leitura por dia.

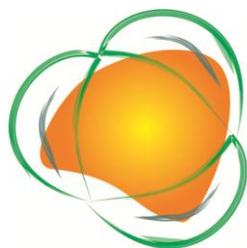
Na Figura 1 é possível observar a leitura do resultado visual para a degradação do óleo mineral.

Tempo de análise	Controle 1	Controle 2	Isolado 1	Isolado 2
Antes de incubar				
Depois de incubar				

**Figura 1.** Resultado visual do teste de degradação de óleo mineral. Na coluna “Controle 1” observa-se que não houve alteração da coloração”- confirmando a esterilidade do meio; “Controle 2” observa-se que não houve alteração da coloração – confirmando a esterilidade do óleo; “Isolado 1” não houve a mudança da coloração – significando que o isolado não é capaz de degradar o óleo mineral em 24 horas; “Isolado 2” houve mudança na coloração - significando que o isolado é capaz de degradar o óleo mineral em 24 horas.

## Resultados e Discussão

Nas 6 coletas realizadas foram isoladas 35 colônias de bactérias. Sendo que 19 (54%) foram Gram positivas e 16 (46%) Gram negativas. Foram encontrados



# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

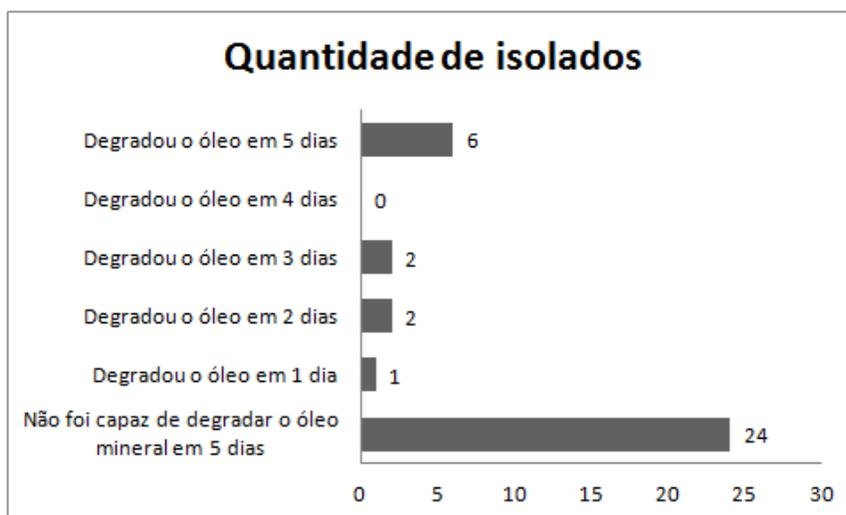
[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS  
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

morfologias do tipo: bacilos (51%), diplobacilo (14%), cocos (11%), estafilococos (11%), diplococos (6%) e estreptobacilo (6%).

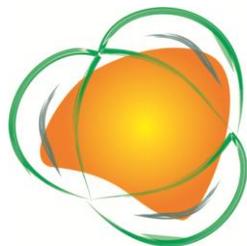
No trabalho realizado por Piubeli et al (2008) foram isoladas de fluido de corte a base de óleo mineral, bactérias com características de cocos Gram positivos e bacilos Gram negativo. Segundo Queissada (2009), bactérias como *Pseudomonas* (Gram negativa – bacilo), *Bacillus* (Gram negativa – bacilo), *Acinetobacter* (Gram positiva/Gram variável – bacilo), *Achromobacter* (Gram negativa – cocobacilo), *Mycococcus* (Gram positiva – cocos), *Flavobacterium* (Gram negativa – bacilo) e *Geobacillus* (Gram positiva – bacilo) são comumente encontrados em ambientes como o fluido de corte.

Na figura 1 é possível observar o resultado do teste de capacidade de degradação do óleo mineral após 5 dias de incubação. Observa-se que a maioria não foi capaz de degradar o óleo mineral (69%) em 5 dias de análise, o que pode representar que estes estão utilizando outro composto existente no fluido de corte como fonte de carbono. Onze isolados foram capazes de degradar o óleo, sendo que 3% degradou em 1 dia, 6% degradou em 2 e 3 dias e 17% em 5 dias.



**Figura 2.** Quantidade de isolados que não foram capazes de degradar o óleo mineral e que foram capazes de degradar em 1,2,3,4 e 5 dias de incubação.

Bakalova et al. (2007) também avaliaram a potencialidade dos microrganismos de degradarem o fluido de corte, onde 15 isolados de fluido de corte foram avaliados quanto a capacidade de degradar hidrocarbonetos, sendo que 10 foram capazes de degradar o composto em questão. Enquanto Rabeinstein et al. (2009), verificou que os microrganismos isolados do fluido de corte a base de óleo mineral não foram capazes de utilizar o óleo mineral como uma única fonte de carbono. Segundo Martins (2008), o



# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

óleo mineral é de difícil degradação, ressaltando a importância de obter microrganismos que sejam capazes de degradar o óleo.

No quadro 1 verifica-se as características morfotintoriais dos isolados que foram capazes de degradar o óleo mineral.

Isolado	Dias necessários para degradar o óleo mineral	Coloração de Gram	Morfologia
B1	1	+	Bacilo
B2	2	+	Cocos
B3	2	+	Diplobacilo
B4	3	-	Bacilo
B5	3	-	Diplobacilo
B6	5	-	Bacilo
B7	5	-	Bacilo
B8	5	-	Diplobacilo
B9	5	-	Estafilococos
B10	5	+	Cocos
B11	5	+	Streptobacilo

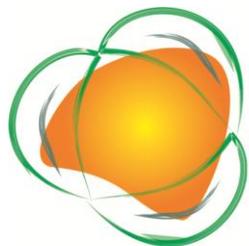
**Quadro 1.** Características morfotintoriais dos isolados que foram capazes de degradar o óleo mineral.

Com os isolados obtidos neste trabalho, pretende-se realizar testes de tratamento biológico do fluido de corte, pois estas bactérias autóctones são mais vantajosas do que outras bactérias por estarem adaptadas ao efluente. Este fato foi relatado no trabalho de Queissada, Silva e Paiva (2011) onde os microrganismos autóctones do efluente de indústria de metal-mecânica se apresentaram mais eficientes na remoção de óleo e graxas, com 62% de eficiência, do que o padrão *Aspergillus niger*.

Segundo Pop et al (2008), a biodegradabilidade dos óleos minerais é inferior a 30%, desta forma, destaca-se a importância de obtenção de microrganismos capazes de degradar o óleo em questão, contribuindo assim no seu tratamento.

### **Conclusões**

Sendo o óleo mineral um composto recalcitrante, é importante encontrar alternativas para auxiliar na sua degradação. Desse modo, as bactérias isoladas no presente trabalho podem auxiliar no tratamento biológico do fluido de corte a base de óleo mineral. Dos isolados analisados verificou-se que 11 são capazes de degradar o óleo mineral.



# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS  
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

## **Referências Bibliográficas**

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO SETOR METALÚRGICO. Anuário Estatístico do Setor Metalúrgico/Secretaria de Geologia, Mineração e Transformação Mineral. Brasília: SGM, 2014. 112p.

BAKALOVA, S., DOYCHEVA, A., IVANOVA, I., GROUDEVA, V., DIMKOV, R., 2007. Bacterial microflora of contaminated metalworking fluids. *Biotechnol. Biotechnol. Eq.* 21, 437 e 441. DOI: 10.1080/13102818.2007.10817490

BIDOIA, E.D., MONTAGNOLLI, R.N., LOPES, P.R.M. 2010 Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2, A. Méndez-Vilas, 1277-1288.

Byers Jerry P. *Metalworking fluids*. 3. ed. London: CRC publishers, 2006.

CHETAN; GHOSH, Surdarsan; RAO, Venkateswara P. Application of sustainable techniques in metal cutting for enhanced machinability: a review. *Journal of Cleaner Production*. p.1-18, mar. 2015

DINIZ, A. E.; MARCONDES, F. C.; COPPINI, N. L. *Tecnologia da usinagem dos materiais*. São Paulo: MM Editora, 1999.

HANSON, K.G.; DESAI, J.D.; DESAI, A.J.. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnol. Tech.*, 7, 745-748.

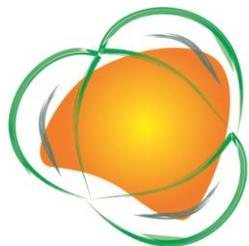
KOCH, T.; PASSMAN, F.; RABENSTEIN, A. Comparative study of microbiological monitoring of water-miscible metalworking fluids. *Internation Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 98. P. 19-25. mar. 2015

MATTSBY-BALTZER, Inger, *Microbial Growth and Accumulation in Industrial Metal-Working Fluids*. *Applied and Environmental Microbiology*. v.55, n. 10, p.2681-2689. 1989

MIRANDA, R.C., SOUZA, C.S.S., GOMES, E.B., LOVAGLIO, R.B., LOPES, C.E.L., SOUZA, M.F.V.Q. 2007. Biodegradation of diesel oil by yeasts isolated from the vicinity of suape port in the state of Pernambuco - Brazil. *Braz. arch. biol. technol.* 50, 1, 147-152.

PIUBELI F.A., GOMES R., ARRUDA O.S., ARRUDA M.S.P., BIANCHI E.C., SILVA JUNIOR C.E., AGUIAR P.R., CATAI R.E. 2008. Caracterização Microbiológica de uma emulsão mineral utilizada como fluido de corte no processo de usinagem. *Revista Iberoamericana de Ingenieria Mecánica*. 12, 1, 35-41.

POP, Loredana, et al. Basestock oils for lubricants from mixtures of corn oil and synthetic diesters *J Am Oil Chem Soc*, v. 85. n. 1. p. 71-76. jan. 2008.



# XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

[www.meioambientepocos.com.br](http://www.meioambientepocos.com.br)

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

PUSAVEC, F., KRAJNIK, P., KOPAC, J. Transitioning to sustainable production – Part I: application on machining technologies. *Journal of Cleaner production*.v. 18. n. 2. jan.2010.

QUEISSADA, D. D.; SILVA, F. T.; PAIVA, T. C. B. Tratamentos integrados em efluente metal-mecânico: precipitação química e biotratamento em reator do tipo air-lift. *Eng. Sanit. Ambient.*, v. 16, n. 2, p. 181-188, abr/jun 2011.

QUEISSADA, D. D. Isolamento e seleção de microrganismos para remediação de efluente oleoso da indústria metal-mecânica. Tese de doutorado em Biotecnologia Industrial. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena – SP, 2009.

RABELLO, I. D.; BINI, E. Manual prático de máquinas ferramentas. São Paulo: Hemus, 2005.

RABENSTEIN, A., KOCH, T., REMESCH, M., BRINKSMEIER, E., KUEVER, J., 2009. Microbial degradation of water miscible metal working fluids. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 1023-1029 doi: 10.1016 / j.ibiod.2009.07.005

VAN DER GAST, C.J.; THOMPSON, I.P. Effects of ph amendment on metal working fluid wastewater biological treatment using a defined bacterial consortium. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 89, p. 357-366, 2004.

WICHMANN, Hubertus et al. Ecological and economic evaluation of a novel glycerol based biocide-free metalworking fluid. *Journal of Cleaner Production*. v. 43. p.12-19. mar. 2013.