

BIODEGRADAÇÃO DE ÓLEO LUBRIFICANTE AUTOMOTIVO USADO PELA APLICAÇÃO DE SURFACTANTE QUÍMICO E BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa*

OLIVEIRA, Luciano Marcondes de; LOPES, Paulo Renato Matos; BIDOIA, Ederio Dino; CONTIERO, Jonas

lmobio@gmail.com

Centro de Pós-Graduação Oswaldo Cruz

Resumo

*A poluição causada por petróleo e derivados em ambientes terrestre e aquático é um fenômeno responsável por sérios problemas ecológicos e sociais devido às propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas destes compostos. Dentre os métodos de remediação, a aplicação de tensoativos sintéticos tem sido utilizada na remoção destes hidrocarbonetos do meio ambiente. Contudo, estes surfactantes de origem química geram efeitos tóxicos à biota existente na área impactada além de serem de difícil degradação. Logo, a biorremediação utilizando microrganismos e biosurfactantes surge como uma alternativa, a qual tem estimulado a ciência na busca de tratamentos biológicos eficazes para ambientes contaminados por petróleo e derivados. Assim, a biodegradabilidade de óleo lubrificante automotivo usado foi determinada por método colorimétrico baseado no indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Neste sentido, foi avaliada a eficiência de degradação do óleo usado a partir de dois procedimentos: bioaugmentação, utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*; e a adição de surfactante, aplicando surfactante químico e biosurfactante (ramnolípido) produzido por *P. aeruginosa*. Os resultados demonstraram que a inoculação da bactéria (bioaugmentação) proporcionou maior taxa de biodegradação do lubrificante usado em comparação à adição de surfactantes de origem química e microbiana.*

Palavras-chave: bioaugmentação; biorremediação; colorimetria; óleo lubrificante; surfactante.

Abstract

*Environmental pollution by petroleum and its derivatives is causing serious ecological and social damages due to toxic, mutagenic and carcinogenic properties of these compounds. Among remediation methods, the application of synthetic surfactants has been used for removal of hydrocarbons from the environment. However, these chemical compounds generate toxic effects for biota and they are not biodegradable. Therefore, bioremediation using microorganisms and biosurfactants is an alternative, which has stimulated the science for effective treatments of soil and water contaminated by petroleum hydrocarbons. In this study, the biodegradability of waste lubricant oil was determined by colorimetric method based on redox indicator 2,6-dichlorophenol indophenol (DCPIP). Thus, it was evaluated the degradation of waste oil from two procedures: bioaugmentation, using the bacteria *Pseudomonas aeruginosa*; and the addition of surfactants, applying chemical surfactant and biosurfactant (ramnolipid) produced by *P. aeruginosa*. The results showed that bacteria inoculum (bioaugmentation) provided higher biodegradation rate of waste lubricant oil in comparison to the addition of chemical and microbial surfactants.*

Key words: bioaugmentation; bioremediation; colorimetry; lubricant oil; surfactant.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos derivados de petróleo são disseminados pelo mundo todo e seu uso intenso está associado à descarga de hidrocarbonetos ao meio ambiente. A contaminação ambiental por derivados de petróleo tem sido alvo de diversos estudos há pelo menos quatro décadas. Neste sentido, sabe-se que a poluição por petróleo e derivados pode ocorrer nas diferentes etapas de produção, tais como: exploração, refino, transporte e armazenamento (ATLAS, 1995).

O maior obstáculo associado à biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo está na diversidade estrutural destas substâncias, sendo formados por 20 ou mais átomos de carbono. Estes compostos de cadeia longa não são facilmente metabolizados por microrganismos e, portanto, são considerados de alto risco à biota devido seu potencial mutagênico e carcinogênico (BAHERI et al., 2002).

Neste contexto, tem-se que cerca de 1% do petróleo consumido mundialmente está relacionado à produção de óleos lubrificantes automotivos e industriais, cujo processamento, transporte e armazenamento podem gerar impactos ambientais. Ressalta-se ainda que estes lubrificantes são capazes de permanecer por mais de seis anos em alguns ecossistemas, resultando em efeitos crônicos para a manutenção da vida (AMUND, 1996).

Processos físicos e químicos são os procedimentos mais usais aplicados na remediação de áreas contaminadas com petróleo e derivados, tais como: dispersão, diluição, sorção, volatilização, entre outros. Contudo, esses métodos geralmente requerem a utilização de equipamentos e maquinário pesado, que também podem apresentar impacto ambiental decorrente pela poluição do ar (MATSUMIYA et al., 2007).

Assim, aliada à alta eficiência e baixo custo, os processos de biorremediação representam uma via importante na remoção destes poluentes por conferir bases sustentáveis em função de empregar de ferramentas biológicas no tratamento de áreas contaminadas (BHUPATHIRAJU et al., 2002, LEESSON et al. 1997). A biorremediação explora a habilidade de organismos vivos em degradar contaminantes orgânicos, como por exemplo, os microrganismos. Este processo é dependente das condições ambientais e da estrutura da comunidade microbiana na presença do contaminante, geralmente incrementada por bioaugmentação, bioestimulação ou ambos. Neste contexto, a contribuição de microrganismos autóctones é significativa (LIN et al., 2010).

Segundo Torstensson (1988) e Aichberger et al. (2005), há três pré-requisitos necessários à biorremediação: (i) a disponibilidade de compostos aos microrganismos biodegradadores; (ii) a quantidade de microrganismos presente no ambiente e; (iii) nível de atividade dos microrganismos. Bidoia et al. (2010) complementa, ainda, que a temperatura, pH, aeração, matriz orgânica e nutrientes, também consistem fatores ambientais moduladores dos processos de biodegradação.

Sabendo que a disponibilidade do poluente como fonte de carbono é importante para uma maior taxa de metabolismo microbiana, a biodegradação de petróleo e derivados torna-se dificultada em função da hidrofobicidade inerente às moléculas destes compostos. Todavia, muitas espécies de microrganismos possuem a capacidade de degradarem esses hidrocarbonetos, aumentando sua biodisponibilidade pela diminuição da tensão superficial por meio da produção de biossurfactantes (NIESCHER, et al., 2006).

Fungos, leveduras e bactérias são capazes de produzir uma grande variedade de substâncias de grande aplicação na indústria biotecnológica, como os biossurfactantes (MAKKAR e CAMEOTRA 1999, NITSCHKE e PASTORE, 2006). Apesar das inúmeras vantagens destes compostos em relação aos surfactantes de origem química, como baixa toxicidade, biodegradabilidade e alta estabilidade, estes biotensoativos não são amplamente utilizados, devido ao custo de produção. Ao mesmo tempo, estudos já realizados direcionam-

se para a produção de biossurfactantes a partir de resíduos agroindustriais (MAKKAR e CAMEOTRA 1999, NITSCHKE e PASTORE, 2006), havendo poucos relatos que detalham seu comportamento ambiental e sua aplicação em ambientes contaminado por hidrocarbonetos.

Há também outras estratégias adotadas com o intuito de acelerar a atividade biológica na degradação dos hidrocarbonetos, tais como: bioestimulação e bioaumentação. A bioestimulação refere-se à adição de nutrientes na área impactada, favorecendo o metabolismo microbiano na degradação destas substâncias. Já a bioaumentação consiste no enriquecimento da microbiota autóctone por meio da introdução de microrganismos exógenos capazes de utilizar estes compostos como substrato (AISLABIE, et al., 2006).

É importante salientar que métodos viáveis na geração de dados associados à biodegradação são fundamentais à elaboração de referências quanto à biodegradabilidade de determinadas substâncias. Ao mesmo tempo, estudos sobre caracterização e perfil de bactérias específicas à biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo podem fornecer subsídios às tomadas de decisão estratégicas na escolha da técnica de biorremediação mais adequada (BIDOIA et al., 2010). Desse modo, muitas técnicas já foram estudadas e se demonstram capazes de avaliar precisamente o processo de biodegradação por microrganismos, estando incluso o método colorimétrico (HANSON, et al., 1993).

A colorimetria aplicada a estudos de biodegradação utiliza o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP). A técnica está fundamentada na alteração de cor deste composto quando reduzido. Assim, quando o indicador DCPIP está oxidado sua coloração é azul, e quando reduzido é incolor (BIDOIA et al., 2010).

A mudança de cor é devida à mudança na estrutura da molécula de DCPIP. O átomo de nitrogênio no centro da molécula é o aceptor de elétrons onde ocorre a mudança da ligação dupla entre nitrogênio e carbono para um ligação simples (Figura 1). A mudança na ligação faz com que uma alteração da molécula ocorra. Sendo assim, a redução causa a mudança de cor de azul para incolor. Esta mudança de cor pode, no entanto, ser usada em uma série de reações em que ocorram trocas de elétrons como a biodegradação de compostos (BIDOIA et al., 2010).

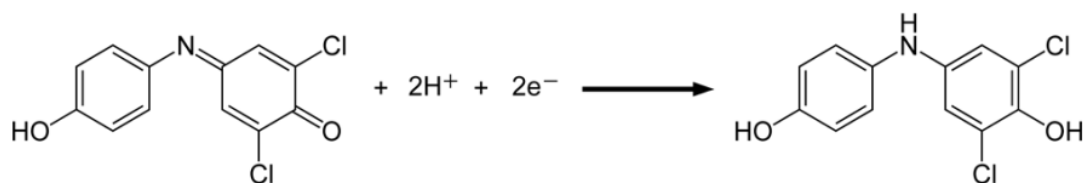


Figura 1 - Reação do indicador 2,6-diclorofenol-indofenol como aceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula (BIDOIA et al., 2010).

Desta forma, o presente estudo visou avaliar a biodegradação de óleo lubrificante automotivo usado pela bioaumentação com *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria potencialmente produtora de biossurfactante (ramnolípídeo). Além disso, comparou-se o efeito da aplicação de surfactante químico e biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* na biodegradação de óleo usado. Portanto, este estudo favorece o desenvolvimento de novas estratégias de biorremediação para ambientes contaminados por hidrocarboneto de petróleo.

1. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Soluções aquosas de surfactante químico e biossurfactante

Foram preparadas duas soluções de surfactantes para realização dos experimentos: (1) biosurfactante (BSf) produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir de borra de soja e (2) surfactante químico comercial Tween[®] 80 (Tw).

Ambas as soluções foram preparadas na concentração de 1,0% (m/v) diluindo 1,000 g de surfactante em 1,0 L de água destilada. Posteriormente, as soluções BSf e Tw foram homogeneizadas em balão volumétrico de 1,0 L e armazenadas separadamente em recipientes de vidro mantidos em geladeira a 4 °C.

3.2 Óleo lubrificante automotivo usado

O óleo lubrificante automotivo usado utilizado nos ensaios de biodegradação foi Shell[®] Helix HX5 - SAE 15W-50, de origem mineral.

A coleta do lubrificante usado foi realizada em estabelecimento comercial (centro de lubrificação automotiva) no município de José Bonifácio-SP. É importante ressaltar que este óleo foi obtido após seu uso em motor automobilístico.

3.3 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolada por Benincasa et al. (2002) em solo contaminado por petróleo. A linhagem foi mantida em caldo nutriente com 20% de glicerol a -20 °C (COSTA et al., 2006).

Quando necessário, a cultura era inoculada em meio ágar nutriente (NA). Após ser autoclavado a 121 °C e 1,00 atm durante 15 minutos, o meio NA foi distribuído em tubos de ensaio e estes, posteriormente, inclinados. Os repiques foram realizados periodicamente e incubados a 35 °C por 24 horas e, em seguida, utilizados ou armazenados a 4 °C em geladeira.

3.4 Meios de Cultura

1.4.1. Caldo nutriente e ágar nutriente

Os meios caldo nutriente (CN) e ágar nutriente (NA) foram preparados dissolvendo 13,0 g de Nutrient Broth - Himedia[®] em 1,0 L de água destilada. Também, na composição do meio NA foi acrescentado 17,0 g de ágar - Acumedia[®].

1.4.2. Bushnell-Hass (BH)

O meio salino Bushnell-Hass (BH) foi preparado pela dissolução dos sais apresentados na Tabela 1 em 1,0 L de água destilada em balão volumétrico de mesmo volume.

Tabela 1 – Composição do meio Bushnell-Hass no preparo de 1,0 L

Composto	Massa (gramas)	Composto	Massa (gramas)
MgSO ₄	0,200	KH ₂ PO ₄	1,000
CaCl ₂	0,020	K ₂ HPO ₄	1,000
FeCl ₃	0,050	NH ₄ NO ₃	1,000

3.5 Solução de indicador redox DCPIP

A solução do indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) foi preparada na concentração de 1,00 g.L⁻¹. Deste modo, 0,100 g de DCPIP foram dissolvidos em 100 mL do meio salino BH e a solução homogeneizada em balão volumétrico de mesmo volume. O armazenamento da solução de DCPIP 1,00 g.L⁻¹ foi realizado em frasco âmbar de vidro, ao abrigo de luz e mantido a 4 °C em geladeira.

3.6 Inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI

Para o inóculo de *P. aeruginosa* LBI, foram obtidos microrganismos provenientes de uma cultura estoque em glicerina, armazenada a -25 °C. Por meio de uma alça de inoculação, foram inseridas três alçadas em dois frascos erlenmeyer contendo 50 mL de caldo nutriente em cada. A seguir, os frascos foram mantidos em agitação em uma incubadora shaker por 24 h a 35°C e 150 rpm, de forma a favorecer o crescimento da cultura.

3.7 Método colorimétrico

A colorimetria utilizando indicador DCPIP foi utilizada para estabelecer comparação da velocidade de degradação do óleo lubrificante automotivo usado pela aplicação de surfactante químico Tween[®]80 e de biosurfactante. Ambos também foram comparados quanto à inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* LBI.

O método colorimétrico foi realizado segundo Hanson et al. (1993) e Bidoia et al. (2010), com adaptações. Os resultados consideraram a alteração da coloração do meio e as leituras absorvância ao longo do tempo de incubação.

3.7.1 Montagem dos ensaios

A colorimetria foi conduzida em tubos de ensaio com tampa, próprios para leitura no espectrofotômetro Hach[®] Odissey DR-2500. A composição dos ensaios colorimétricos está apresentada pela Tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos ensaios colorimétricos

Ensaio	Sigla	Composição	Volumes					
			Meio BH (mL)	DCPIP (µL)	Óleo usado (µL)	Inóculo (µL)	Surfactante (µL)	Água (µL)
Branco	BR	BH	7,5	-	-	-	-	900
Controle do Meio	C.DCPIP	BH+DCPIP	7,5	400	-	-	-	500
Controle Tween [®] 80	C.Tw	BH+DCPIP+Tw	7,5	400	-	-	250	250
Controle Biosurfactante	C.BSf	BH+DCPIP+BSf	7,5	400	-	-	250	250
Controle Inóculo	C.In	BH+DCPIP+In	7,5	400	-	200	-	300
Inóculo e Tween [®] 80	In + Tw	BH+DCPIP+In+Tw	7,5	400	-	200	250	50
Inóculo e Biosurfactante	In + BSf	BH+DCPIP+In+BSf	7,5	400	-	200	250	50
Lubrificante	Lub	BH+DCPIP+Lub	7,5	400	50	-	-	450
Lubrificante e Tween [®] 80	Lub + Tw	BH+DCPIP+Lub+Tw	7,5	400	50	-	250	200
Lubrificante e Biosurfactante	Lub + BSf	BH+DCPIP+Lub+BSf	7,5	400	50	-	250	200

Lubrificante e Inóculo	<i>Lub + In</i>	<i>BH+DCPIP+Lub+In</i>	7,5	400	50	200	-	250
Lubrificante, Inóculo e Tween[®]80	<i>Lub + In + Tw</i>	<i>BH+DCPIP+Lub+In+ Tw</i>	7,5	400	50	200	250	-
Lubrificante, Inóculo e Biossurfactante	<i>Lub + In + BSf</i>	<i>BH+DCPIP+Lub+In+ BSf</i>	7,5	400	50	200	250	-

Na montagem dos ensaios colorimétricos, foram utilizadas as seguintes substâncias: (a) meio salino Bushnell-Hass – BH; (b) solução do indicador – DCPIP; (c) óleo lubrificante automotivo usado – Lub; (d) inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* LBI – In; (e) solução de surfactante químico Tween[®]80 – Tw; (f) solução de biossurfactante – BSf; e (g) água destilada.

É importante ressaltar que todo material utilizado na montagem dos ensaios foram autoclavados, com exceção de “In” e “Lub”.

Deste modo, os ensaios foram realizados em triplicata, totalizando 36 tubos além do Branco. Todos os tubos foram agitados em vortex por 10 segundos e incubados a 35 °C e 150 rpm por 120 h.

3.7.2 Acompanhamento da biodegradação

O monitoramento da biodegradação foi realizado três vezes ao dia (a cada 8 h) até o total de 120 h. Assim, a coleta de dados nos tubos foi feita diariamente às 7:00 h, 15:00 h e 23:00 h. A análise foi realizado por medidas qualitativas e quantitativas.

3.7.3 Medidas qualitativas

A análise qualitativa monitorou a alteração de coloração dos meios contendo o indicador redox DCPIP de azul para incolor nos diferentes ensaios. Esta avaliação foi feita por meio de registro fotográfico devidamente organizado em um banco de dados contendo as imagens. Os registros fotográficos seguiram um mesmo padrão de iluminação e ordenação dos tubos e foram realizados a cada coleta de dados, ou seja, a cada 8 h.

Deste modo, foram obtidas três pranchas a cada leitura, diferenciando os ensaios pela presença ou não de surfactante químico, biossurfactante e inóculo. A ordem dos tubos em todas as imagens obtidas em função do tempo segue abaixo (da esquerda para a direita):

- Prancha 1 (Ensaio Tween[®]80 - Tw)

(BR) Branco; (C.DCPIP) Controle do Meio; (C.Tw) Controle Tween[®]80; (C.In) Controle Inóculo; (In + Tw) Inóculo + Tween[®]80; (Lub) Lubrificante; (Lub + Tw) Lubrificante + Tween[®]80; e (Lub + In + Tw) Lubrificante + Inóculo + Tween[®]80.

- Prancha 2 (Ensaio Biossurfactante - BSf)

(BR) Branco; (C.DCPIP) Controle do Meio; (C.BSf) Controle Biossurfactante; (C.In) Controle Inóculo; (In + BSf) Inóculo + Biossurfactante; (Lub) Lubrificante; (Lub + BSf) Lubrificante + Biossurfactante; e (Lub + In + BSf) Lubrificante + Inóculo + Biossurfactante.

- Prancha 3 (Ensaio Inóculo - In)

(BR) Branco; (C.DCPIP) Controle do Meio; (Lub) Lubrificante; (Lub + Tw) Lubrificante + Tween[®] 80; (Lub + BSf) Lubrificante + Biossurfactante; (Lub + In) Lubrificante + Inóculo; (Lub + In + Tw) Lubrificante + Inóculo + Tween[®] 80; e (Lub + In + BSf) Lubrificante + Inóculo + Biossurfactante.

3.7.4 Medidas quantitativas

Inicialmente, foi necessário estabelecer o comprimento de onda de maior absorbância para a solução de DCPIP. Realizou-se um espectro de absorbância da solução do indicador com o espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu[®] 2401PC (Figura 2).

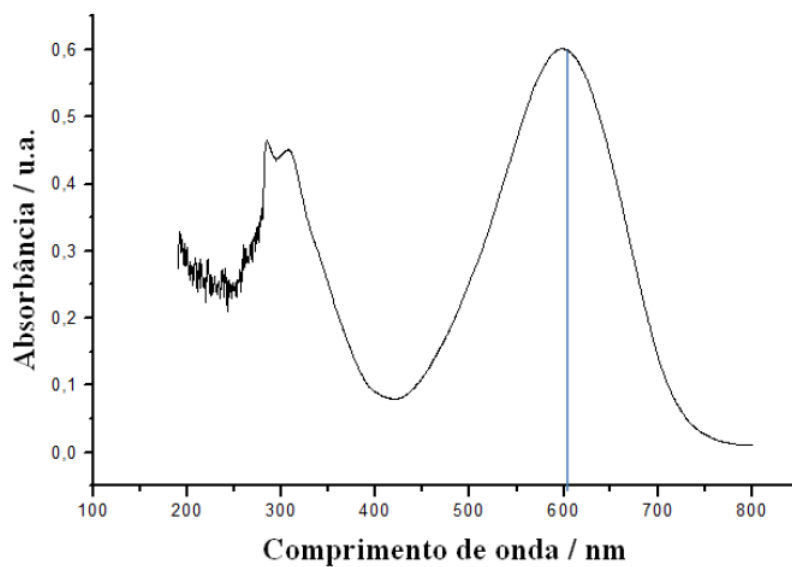


Figura 2 – Espectro de absorção UV-Vis do indicador redox DCPIP.

Observando a Figura 2, tem-se que o comprimento de onda de maior absorbância para a solução de DCPIP foi de 600 nm.

Deste modo, fez-se necessário a confecção de uma reta padrão relacionando a absorbância da solução a 600 nm e a concentração de DCPIP em seu estado oxidado (azul). Foram preparadas cinco soluções com diferentes concentrações de DCPIP em meio BH a partir da solução inicial a 1,0 g.L⁻¹. O volume total do tubo foi o mesmo a ser transferido aos ensaios de colorimetria, ou seja, 8,40 mL. Assim, a reta padrão foi elaborada a partir de cinco diluições do indicador em caldo BH

Assim, foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm nos tubos contendo as cinco soluções de concentrações conhecidas no espectrofotômetro Hach[®] Odissey DR-2500, conforme apresentado pela Tabela 3.

Tabela 3 – Composição dos tubos, concentração de DCPIP e valores de absorbância obtidos na elaboração da reta padrão

Tubos	Volumes (mL)			[DCPIP]	Absorbância
	Meio BH	DCPIP 1,0 g.L ⁻¹	Água destilada	(mg.L ⁻¹)	600 nm u.a.
0	7,500	0,000	0,900	0,000	0,000
1	7,500	0,050	0,850	5,952	0,382
2	7,500	0,100	0,800	11,905	0,767

3	7,500	0,200	0,700	23,809	1,505
4	7,500	0,300	0,600	35,714	2,296
5	7,500	0,400	0,500	47,619	2,931

A partir dos dados de absorbância e das concentrações de DCPIP em solução, foi obtido a reta padrão com alto grau de confiança ($R^2 = 0,999$) e expressa pela equação abaixo:

$$[DCPIP] = (15,171 * Abs_{600}) - 0,488$$

onde:

[DCPIP] = concentração do indicador redox DCPIP, em $mg.L^{-1}$;

Abs_{600} = absorbância no comprimento igual a 600 nm.

A análise quantitativa realizou um acompanhamento na concentração do indicador DCPIP em seu estado oxidado (coloração azul). A determinação foi feita em espectrofotômetro Hach®Odyssey DR-2500 pela medida de absorbância no comprimento de 600 nm a cada 8 h.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Medidas Qualitativas

Os registros fotográficos realizados na análise qualitativa do método colorimétrico estão apresentados pela Figura 3 para todos os ensaios em três tempos distintos: t0 (inicial), t64 e t120 (final). A

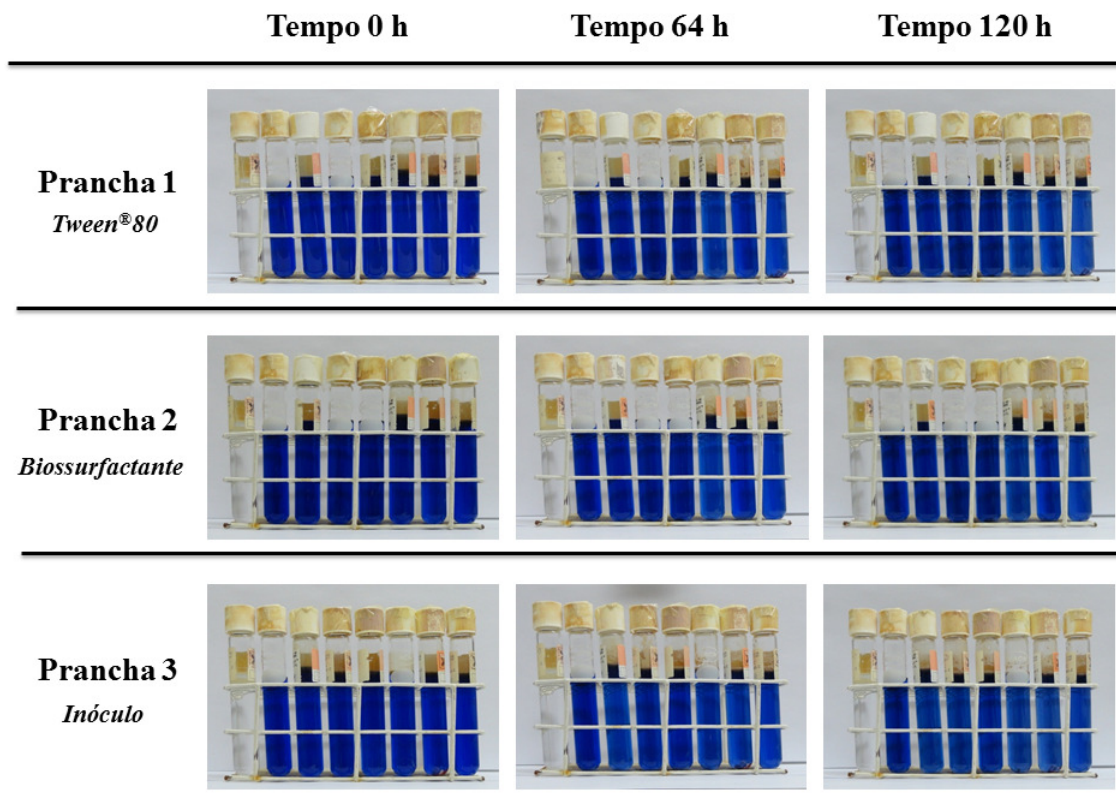


Figura 3 – Medidas qualitativas por registro fotográficos dos ensaios colorimétricos no tempo inicial (t0), após 64 h (t64) e no tempo final (t120).

2.2. Medidas Quantitativas

A redução na concentração de DCPIP nos tubos obtida pelas leituras de absorbância pode ser observada pela Figura 4 abaixo.

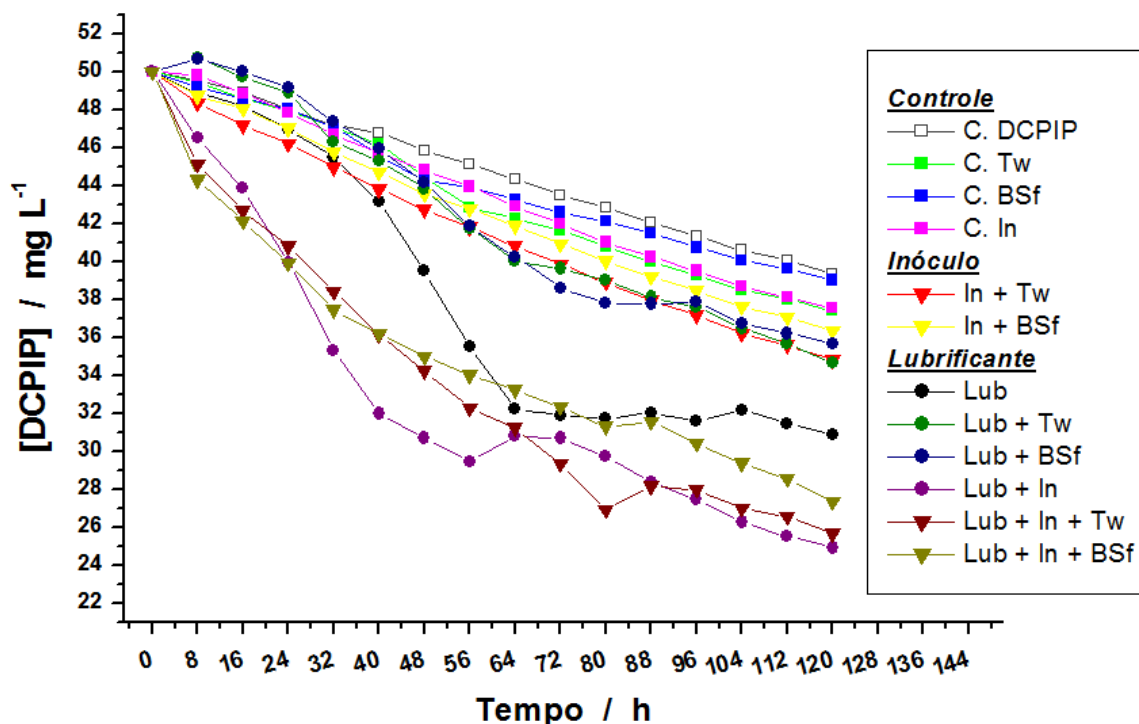


Figura 4 – Concentração do indicador DCPIP nos ensaios colorimétricos pelo tempo de incubação.

Também, foram estabelecidas as porcentagens de descoloração dos ensaios de azul (oxidado) para incolor (reduzido) em relação ao controle do meio DCPIP após 120 h de incubação (Tabela 4).

Tabela 4 - Porcentagem de descoloração em relação ao controle do meio – C.DCPIP

Ensaio	Sigla	Porcentagem de descoloração (t120)
Controle Tween [®] 80	C. Tw	4,97%
Controle Biossurfactante	C. BSf	0,81%
Controle Inóculo <i>P. aeruginosa</i>	C. In	4,56%
Inóculo + Tween [®] 80	In + Tw	11,54%
Inóculo + Biossurfactante	In + BSf	7,60%
Lubrificante	Lub	21,55%
Lubrificante + Tween [®] 80	Lub + Tw	11,88%
Lubrificante + Biossurfactante	Lub + BSf	9,42%
Lubrificante + Inóculo	Lub + In	36,70%
Lubrificante + Inóculo + Tween [®] 80	Lub + In + Tw	34,79%
Lubrificante + Inóculo + Biossurfactante	Lub + In + BSf	30,55%

2.3. Discussão dos resultados

O método colorimétrico com o indicador redox DCPIP foi empregado em diversos trabalhos pela simples análise do tempo de descoloração do meio (MARIANO et al., 2008, MARIANO, et al.(2) 2008) Estes autores avaliaram a velocidade de biodegradação de diferentes compostos estabelecendo o tempo final de alteração da cor do meio de azul para incolor.

Neste sentido, os resultados apresentados acima revelam a importância de se realizar o monitoramento da biodegradação por medidas qualitativas e quantitativas, pois não foi possível estabelecer o tempo final de descoloração dos ensaios mesmo após 120 h de incubação (Figura 3). Contudo, a análise quantitativa realizada por leituras de absorbância (Figura 4 e Tabela 4) evidenciou que os ensaios comportaram-se de maneira distinta ao longo do tempo. Desta forma, o presente estudo destaca o emprego de medidas quantitativas para melhor compreensão dos processos biológicos no metabolismo de compostos poluentes.

Foi observado que os ensaios “Controle” (C.DCPIP, C.Tw, C.BSf e C.In) e “Inóculo” (In+Tw e In+BSf), que não apresentaram o óleo lubrificante usado em sua composição, tiveram pouca descoloração do meio (Figura 3) e baixa redução na concentração do indicador (Figura 4). Os valores na porcentagem de descoloração do meio variaram entre 0,81% (ensaio C.BSf) e 11,54% (ensaio In+Tw). A falta da fonte de carbono indicou uma menor taxa de redução na concentração de DCPIP, pois a atividade microbiana nestes ensaios foi pequena pela ausência do lubrificante usado. Este resultado fica evidenciado pela pequena diferença nos valores de concentração de DCPIP entre estes ensaios e a amostra controle do meio (C.DCPIP) ao longo do tempo, conforme apresentado pela Figura 4.

Por outro lado, quando o óleo lubrificante usado foi adicionado, a redução na concentração de DCPIP foi evidente na maioria dos ensaios (Figura 4). A própria microbiota associado ao óleo usado teve atividade detectada pelas leituras de absorbância, como é observado na curva obtida no ensaio “Lub” na Figura 4 e também pela taxa de descoloração de 21,55% em relação ao controle do meio (Tabela 4).

Entretanto, a adição de surfactantes junto ao lubrificante teve efeito negativo na biodegradação deste hidrocarboneto. Nos ensaios Lub+Tw e Lub+BSf, a concentração do DCPIP ao longo do tempo seguiu o padrão observado pelos ensaios “Controle” e “Inóculo” e suas porcentagens de descoloração foram de 11,88% e 9,42%, respectivamente. Este resultado pode ser devido aos surfactantes terem influência na interface microrganismo-óleo que permitiram maior solubilização do lubrificante no meio e, portanto, menor biodisponibilidade do composto como substrato.

Em contrapartida, a técnica de bioaugmentação utilizando a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI indicou a maior taxa de biodegradação do lubrificante usado. Nos ensaios contendo o inóculo juntamente ao óleo, a redução na concentração de DCPIP demonstrou-se nítida, com porcentagens de descoloração acima de 30,00% em relação ao controle do meio. Este resultado deve-se à intensa atividade microbiana referente à biodegradação do lubrificante automotivo usado, o qual se revelou passível de ser utilizado como fonte de carbono pela bactéria *P. aeruginosa* LBI.

Ainda, foi observado que a utilização dos surfactantes nestes ensaios contendo o inóculo também teve uma leve ação inibitória acerca do potencial microbiano em metabolizar o óleo lubrificante usado. Porém, apesar dos valores na porcentagem de descoloração ser menores que no ensaio ausente de surfactante (Lub+In), esta diferença foi pequena.

3. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados pelo método colorimétrico, concluiu-se que a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* LBI foi capaz de metabolizar o óleo lubrificante usado,

proporcionando maior taxa de biodegradação deste composto em comparação ao tratamento sem a bioaugmentação.

Em contrapartida, foi observado que a aplicação de surfactante químico e biosurfactante não teve nenhum efeito na degradação do óleo pelos microrganismos, quando utilizado juntamente com o inóculo de *P. aeruginosa*. Porém, a adição destes tensoativos somada apenas ao lubrificante demonstrou efeito negativo no potencial de biodegradação da microbiota associada ao hidrocarboneto.

Ademais, destaca-se a importância da análise quantitativa aliada às medidas qualitativas. Ao monitorar a concentração do indicador DCPIP por espectrofotometria, foi possível evidenciar as diferentes taxas de biodegradação encontradas em cada ensaio colorimétrico. Embora tenha sido observada uma ligeira alteração de cor nos ensaios inoculados com *P. aeruginosa* LBI, ressalta-se que a análise qualitativa demandaria tempo maior de avaliação para determinar a velocidade de degradação para todos os ensaios. Além disso, não é possível estabelecer o padrão da biodegradação do lubrificante como nas medidas de absorvância.

Por fim, nota-se que o método colorimétrico proposto representa uma importante ferramenta para fundamentação científica na busca por alternativas de remediação de áreas contaminadas. A técnica demonstrou inúmeras vantagens como: simplicidade, reprodutibilidade, baixo custo e versatilidade para o estudo de perfis de biodegradação de diferentes compostos com diversos microrganismos em condições variadas.

4. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, pelo apoio e suporte fornecido. Também, agradecemos os apoios financeiros do CNPq e da FAPESP.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICHBERGER, H., HASINGER, M., BRAUN, R., LOIBNER, A.P. Potential of preliminary test methods to predict biodegradation performance of petroleum hydrocarbons in soil. **Biodegradation**. V.16: p. 115–125. 2005.

AISLABIE, J., SAUL, D.J., FOGHT, J.M. **Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils**. **Extremophiles**. p. 171–179. 2006.

AMUND, O.O. Utilization and degradation of an ester based synthetic lubricant by *Acinetobacter lwoffii*. **Biodegradation**. 1996;7:91-95.

ATLAS, R.M. Bioremediation of petroleum pollutants. **International Biodeterioration and Biodegradation**. V.35(1-3): p. 317-327. 1995.

BAHERI H, MEYSAMI, P. Feasibility of fungi bioaugmentation in composting a flare pit soil. **Journal of Hazardous Materials**.; V. B89: p.279–286. 2002.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M.A.; MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.

BHUPATHIRAJU, V.K., KRAUTER, P., HOLMAN, H.Y.N., CONRAD, M.E., DALEY, P.F., TEMPLETON, A.S., HUNT, J.R., HERNANDEZ, M., ALVAREZ-COHEN L. Assessment of in-situ bioremediation at a refinery waste-contaminated site and an aviation gasoline contaminated site. **Biodegradation**; V.13: p.79–90. 2002

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

BURNS, K.A., GARRITY, S., JORISSEN, D., MACPHERSON, J., STOELTING, M., TIERNEY, J., YELLE SIMMONS, L. The Galeta oil spill II: unexpected persistence of oil trapped in mangrove sediment. **Estuarine Coastal and Shelf Science**. Rio Claro-SP. HOLOS Environment.; V. 8(2): p. 166-178. 2008.

COSTA, S.G.V.A.O.; NITSCHKE, M.; HADAD, R.; EBERLIN, M.N.; CONTIERO, J. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. **Process Biochemistry**, n 41, p. 483-488, 2006.

HANSON, K.G.; DESAI J.D.; DESAI A.J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n. 10, p. 745-748, 1993.

LEESON, A., HINCHEE, R.E. **Soil Bioventing, Principles and Practice**. CRC, Lewis Publishers, Boca Raton; 1997.

LIN, T., PAN, P., CHENG, S. Ex-situ bioremediation of oil-contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**; V.176: p. 27–34. 2010.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources - A review. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 2, p. 237-241, 1999.

MARIANO, A.P (2), TOMASELLA, R.C., OLIVEIRA, L.M., CONTIERO, J., ANGELIS, D.F. Biodegradability of diesel and biodiesel blends. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 7 (9), pp. 1323-1328, 2008.

MARIANO, A.P.; BONOTTO, D.M.; ANGELIS, D.F.; PIRÔLLO, M.P.S.; CONTIERO, J. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 133-142, 2008.

MATSUMIYA, Y., KUBO, M. **Bioprocess handbook**. 1st ed. Tokyo, NTS Publishing; 2007.

NIESCHER, S, WRAY, V., LANG, S., KASCHABEK, S.R., SCHLÖMANN, M. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V. 70: p. 605–611. 2006.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

TORSTENSSON, L. Microbial decomposition of herbicides in the soil. **Outlook in Agriculture**. V. 17: p. 120-124.