



## **Obtenção de isolados halofílicos nativos de pescado salgado com potencial para uma futura aplicação em biodegradação de resíduos salinos**

**Thayli Ramires Araujo <sup>1</sup>, Roger Vasques Marques <sup>2</sup>, Flávia Voloski <sup>3</sup>, Luciara Bilhalva Corrêa <sup>4</sup>, Érico Kunde Corrêa <sup>5</sup>.**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas / thayliraraujo@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade de Caxias do Sul / rvmarques@ucs.com.br

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas / fla\_voloski@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas / luciarabc@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas / ericoundecorrea@yahoo.com.br

### **Resumo**

A geração e destinação de resíduos tem se tornado uma problemática para a sociedade nas recentes décadas. Estatísticas relatam que, um brasileiro gera diariamente cerca de 800 g de resíduo, como embalagens, papéis, pilhas, alimentos entre outros produtos de consumo (VARGAS, 2015). Na atividade industrial um dos grandes problemas é a emissão de efluentes que promove a contaminação dos corpos hídricos (Monteiro, et al., 2001). Um fator que agrava a contaminação do meio que é o excesso de cloreto de sódio (NaCl) ocorrido tanto nos resíduos industriais quanto nos resíduos domiciliares. Tendo em vista esses aspectos o objetivo desse trabalho foi isolar micro-organismos halofílicos e caracterizar o comportamento do crescimento microbiano perante matéria orgânica com alto teor de sais. Os micro-organismos foram isolados da amostra bacalhau seco salgado adquirido no comércio local na cidade de Pelotas do estado do Rio Grande do Sul. A amostra foi dividida em três partes iguais para o crescimento microbiano em diferentes condições de temperatura, oxigenação, pH. Foram realizados testes bioquímicos e morfológicos e 4 cepas foram submetidas a fermentação onde se mostraram capazes de resistir um alto teor de sal no meio fermentativo. Conclui-se que as bactérias halofílicas tiveram atividades microbianas a fim de permitir a degradação dos resíduos salinos.

Palavras-chave: halofílicos, bacalhau, resíduos salinos.

Área temática: Tecnologias Ambientais

## **Obtain free native halophilic of salted fish with potential for future application in biodegradation of salt residues.**

### **Abstract**

The generation and disposal of waste has become a problem for society in the recent decades. Statistics reports that Brazilians generates about 800 g of wastes daily such as packaging, paper, batteries, food and other consumer products residues (Vargas, 2015). In the industrial activity, one of the major problems is the emission of effluents that promotes contamination of water bodies (Miller, et al., 2001). One factor that worsens the contamination of the environment, is the excess of sodium chloride (NaCl) occurred in both industrial waste as in



household waste. Considering these aspects, the aim of this study was to isolate halophilic microorganisms and characterize the behavior of microbial growth towards organic matter with a high content of salts. The micro-organisms were isolated from dried salted cod purchased in local shops in the city of Pelotas in the State of Rio Grande do Sul. The sample was divided into three equal parts for microbial growth in different conditions of temperature, oxygenation, pH. Biochemical and morphological tests were performed and four strains were subjected to fermentation which have proved able to withstand a high salt content of the fermentation medium. It follows that the halophilic bacteria had microbial activities in order to enable the degradation of salt residues.

**Keywords:** halophilic, cod, salt residues.

**Theme Area:** Environmental Technologies



## 1 Introdução

O consumo e a geração de resíduos estão ligados diretamente à renda e qualidade de vida, pois quanto maior é o poder aquisitivo maior a necessidade de adquirir bens. Assim, pressionando o mercado subsequente a indústria ao aumento de produção. Estudos realizados comprovam que uma região pobre gera menos resíduos do que uma região rica em um intervalo de tempo (GIOVANETTI, 2014).

Na atividade industrial há uma grande geração de resíduos, rejeitos gasosos, líquidos e sólidos nocivos ao meio ambiente. Um dos grandes problemas é a emissão de efluentes havendo a contaminação do corpo d'água (MONTEIRO, et al., 2001).

Os tratamentos industriais para os resíduos gerados podem ser classificados como físico, químico e biológico. Sendo o físico, químico e biológico que pode ocorrer em processos aeróbicos como lagoas aeradas, filtros biológicos e os sistemas de lodos ativados e anaeróbicos lagoas anaeróbias, os tanques sépticos, os filtros anaeróbios e os reatores de alta taxa, capazes de receber maiores quantidades de carga orgânica por unidade volumétrica, como os reatores UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket) ou RAFAs (Reatores Anaeróbios de Fluxo Ascendente) (FREIRE et al., 2000).

As bactérias requerem níveis acima de 50% de umidade para crescerem, leveduras requerem níveis menores, e fungos necessitam de níveis menores ainda. O menor valor encontrado de atividade de água para bactérias de qualquer tipo foi 0,75 (bactérias halofílicas) as quais necessitam e conseguem se desenvolver em altas concentrações salinas. Aqueles que sobrevivem, crescem em até 2% de NaCl e inibem crescimento mas toleram até 15% de NaCl são chamados de halodúricos. Altas quantidades de sal são necessárias para atingir a atividade de água abaixo 0,80 (JAY, 2005).

Um dos principais resíduos que colaboram para contaminação do meio ambiente são os salinos, podendo ser característicos tanto de resíduos industriais quanto nos resíduos domiciliares. Dependendo do teor salino nos efluentes salinos e sua concentração o número e tipo de organismos afetados variam (MCINTOSH & FIZSIMMONS, 2003). No ramo industrial os setores que mais produzem efluentes salinos são os de química, mineira, petrolífera, têxtil, agroalimentares.

A emissão de efluentes salinos danifica o ciclo biológico natural, atingindo os decompositores no final do ciclo, esses efeitos são resultantes da influência adversa da baixa quantidade de água livre sobre as atividades metabólicas, pois todas as reações químicas das células necessitam de água como solvente para manutenção das reações bioquímicas que sustentam a vida (BRAGA et al., 2005).

De forma geral efluentes com concentrações até 0,5% de salinidade são considerados de baixa salinidade, enquanto os de 3/3,5% de salinidade intermediária e de 3,5% em diante são considerados hipersalinos (salinidade da água do mar) (MCINTOSH & FIZSIMMONS, 2003). Para a obtenção de resultados confiáveis e efetuação do trabalho foi escolhido uma amostra naturalmente salina, como o bacalhau seco salgado, pois é proveniente do mar.

Tendo em vista esses aspectos, objetivou-se o isolamento de micro-organismos halofílicos de bacalhau seco salgado, o cultivo de cepas capazes de crescer em ambientes com diferentes concentrações de sais (4,5%; 7,0%; 9,5%) e simulação do crescimento microbiano *in vitro* dos isolados obtidos.

## 2 Metodologia

Coleta e preparo da matriz analítica



Foram adquiridas aleatoriamente diversas peças de bacalhau seco salgado no comércio local na cidade de Pelotas. As amostras foram coletadas e acondicionadas em caixas térmicas com gelo e então transportadas para o Núcleo Educação Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade da Universidade Federal de Pelotas (NEPERS).

Foram pesados 25g de amostra e homogeneizados em 225mL de caldo lactosado com o pHs ajustados (4,5; 7,0; 9,5) a diluição seriada foi procedida em água peptonada 0,1% estéril, o plaqueamento foi conduzido seguindo as técnicas por esgotamento de superfície (aerobiose) em ágar Sangue e ágar Plate Count Ágar (PCA) em sobrecamada (microaerobiose). As placas foram incubadas em estufa em diferentes temperaturas de (35, 45, 60°C) por 48h. O experimento foi realizado em duplicata.

Após o período de incubação foi avaliada a morfologia, coloração das colônias e do ágar. O processo foi repetido até a obtenção de colônias puras e isoladas, assim iniciando os testes bioquímicos (Vermelho de metila - VM e Voges Proskauer - VP, oxidase, catalase, citrato, indol e hemólise) e morfológico (coloração de Gram).

#### Testes bioquímicos e morfológicos

Os testes do Indol, Catalase, Citrato, VM-VP, Oxidase, Hemólise e Coloração de Gram seguiram metodologia descrita por APHA (2001). Onde uma cultura pura de cada isolado foi submetida aos devidos meios de cultura e reagentes conforme as respectivas técnicas. O teste do Indol foi realizado por incubação em caldo Triptona 1% e leitura após adição do reativo de Kovacs. A produção de catalase foi observada a partir de adição de água oxigenada 3% na cultura pura. O teste Vermelho de metila e Voges-Proskauer foi realizado por incubação no caldo Vm-Vp e leitura para o teste Vp após a adição dos reativos  $\alpha$ -naftol 5% e KOH 40%. Para o teste Vm foi observada a viragem da coloração com a adição do reativo vermelho de metila. O teste da oxidase foi realizado com um esfregaço da cultura pura em uma fita de oxidase e umidificada para constatação do resultado. O Gram foi realizado através de um esfregaço da colônia pura em uma lâmina e foi adicionado subsequentemente os reativos cristal-violeta, lugol, álcool, safranina e fuscina e analisado sua morfologia em microscópio. Para o teste do citrato foi transferido um inóculo da cultura e realizado uma picada ao fundo do tubo de ágar Citrato Simmons e estriado na rampa. A hemólise foi realizada para identificar a presença de enzimas hemolíticas nos isolados testados, a hemoglobina presente no ágar sangue é degradada e o meio perde coloração vermelha.

#### Cultivo *in vitro* e delineamento experimental

Das onze cepas isoladas foram selecionadas quatro para o cultivos *in vitro* suplementados de NaCl. A fim de remover o estado de latência dos isolados, uma alçada de cada cepa foi transferida para tubos de ensaio contendo 10mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) suplementados com diferentes concentrações de NaCl (0,5%; 2%; 5%; 7,5%; 10%), incubados em estufa à 35°C por um “overnight”. Foi transferido 10mL de cada tubo com as diferentes concentrações salinas do BHI contendo o inóculo para um erlenmeyer contendo 190mL de caldo BHI esterilizado com a mesma concentração salina. Os erlenmeyers foram incubados em incubadora com agitação orbital, modelo Shaker (Lactea®), a 35°C/5 h a 100rpm.

A cada hora de fermentação foi retirada uma alíquota de 1mL de cada biorreator e transferidas para uma série de tubos contendo 9mL água peptonada 0,1% e agitados em agitador tipo vórtex. A seguir, foram selecionadas 3 diluições consecutivas e transferida 0,1 mL para uma placa contendo ágar PCA utilizando a técnica por esgotamento de superfície para enumeração das colônias.



As placas foram incubadas a 35°C/24h e a contagem foi realizada pelo método da Contagem Padrão em Placas (CPP).

O processo fermentativo seguiu delineamento completamente casualizado, com três repetições em arranjo bifatorial, sendo o primeiro fator de tratamento ‘tempo de fermentação’ (0; 1; 2; 3; 4; 5h) e o segundo “concentração de NaCl” (0; 2; 5; 7,5; 10%). Os dados obtidos foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) a 95% de confiança. Em caso de significância estatística, os dados foram avaliados por análise de Regressão linear com ajustes a modelos polinomiais de acordo com os seguintes fatores: menor valor de p; menor erro residual; maior  $R^2$  e  $R^2$  ajustado.

### 3 Resultados e discussões

As cepas selecionadas cresceram em mesma temperatura de 45 °C, a Nep0114 em pH 9, Nep0215 em pH 7, Nep0315 pH 4,5 todas por microaerobiose e Nep0115 pH 9 por aerobiose pois apresentou melhor crescimento.

A cepa Nep0114 apresentou concentrações celulares iniciais no início da fermentação ( $x=0$ ) de 7,02; 8,29; 7,62; 6,31 e 4,77 log UFC.mL<sup>-1</sup> para cinco concentrações salinas testadas respectivamente. A tendência de crescimento em ascendência até o tempo máximo do estudo, onde a concentração celular máxima foi observada na concentração salina de 0,5% chegando a 17,57 log UFC.mL<sup>-1</sup> nesse período ( $x=5$ ). Apesar de ter apresentado a menor taxa de crescimento na concentração de 10% de NaCl a cepa Nep0114 apresentou expressiva tolerância a exposição a essa pressão osmótica, chegando a 14,22 log UFC.mL<sup>-1</sup> em 5h. A cepa Nep0114 apresentou a mesma tendência de crescimento em todas as concentrações salinas, (figura 1).

Na Nep0215 houve crescimento durante as 5h, tendo destaque na concentração de 0,5% que atingiu 14,53 UFC.mL<sup>-1</sup> a ( $x=5$ ) e para 10% de NaCl que ao fim de 5h atingiu 12,90 UFC.mL<sup>-1</sup>. A concentração celular inicial a 5% ( $x=0$ ) foi a menor comparando com as outras concentrações salinas, no decorrer do período mostrou-se um maior desenvolvimento chegando ao fim do estudo ( $x=5$ ) atingindo 14,34 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Ambas as cepas, Nep0114 e Nep0215, apresentaram as mesmas características morfológicas assim como semelhante perante as diferentes concentrações salinas a que foram expostas no meio de cultura testada no mosto, (figura 1).

(DODIA, et al., 2006), avaliaram o crescimento de um isolado com as mesmas características morfológicas dessas duas cepas (Nep0114 e Nep0215) e apontam que em até 24h o micro-organismo permaneceu em sua fase de crescimento exponencial em concentrações de NaCl de até 15%, entrando em fase estacionária a partir desse período.

Esse comportamento indica que os isolados não são afetados negativamente por essas concentrações salinas no meio fermentativo as caracterizando como no mínimo halofílicas moderada, pois concentrações acima de 10% não foi objetivo de estudo desse trabalho.

A cepa Nep0115 apresentou concentrações celulares iniciais no início da fermentação, em 0,5% e 2% de concentração NaCl teve a mesma tendência de crescimento em 5h ( $x=5$ ), a 7,5%, a reta decresceu tendo uma concentração de 12,90 UFC.mL<sup>-1</sup> ( $x=0$ ) e 10,9 UFC.mL<sup>-1</sup> a ( $x=5$ ), mesmo em queda ao fim de 5h de estudo o mínimo observado na Nep0115 foi na concentração de 10%, 9,98 UFC.mL<sup>-1</sup> ( $x=5$ ), (figura 1).

Na cepa Nep0315 houve crescimento representativo em todas as concentrações salinas estipuladas exceto a 10% que no período inicial ( $x=0$  e  $x=1$ ) já se mostrou em declínio permanecendo em queda até o fim do estudo. As outras concentrações tiveram ascendência significativa tendo destaque a concentração salina de 2% atingindo o máximo crescimento ( $x=5$ ) 13,31 log UFC.mL<sup>-1</sup> e seu mínimo crescimento ( $x=5$ ) 6,89 log UFC.mL<sup>-1</sup> a 10% de

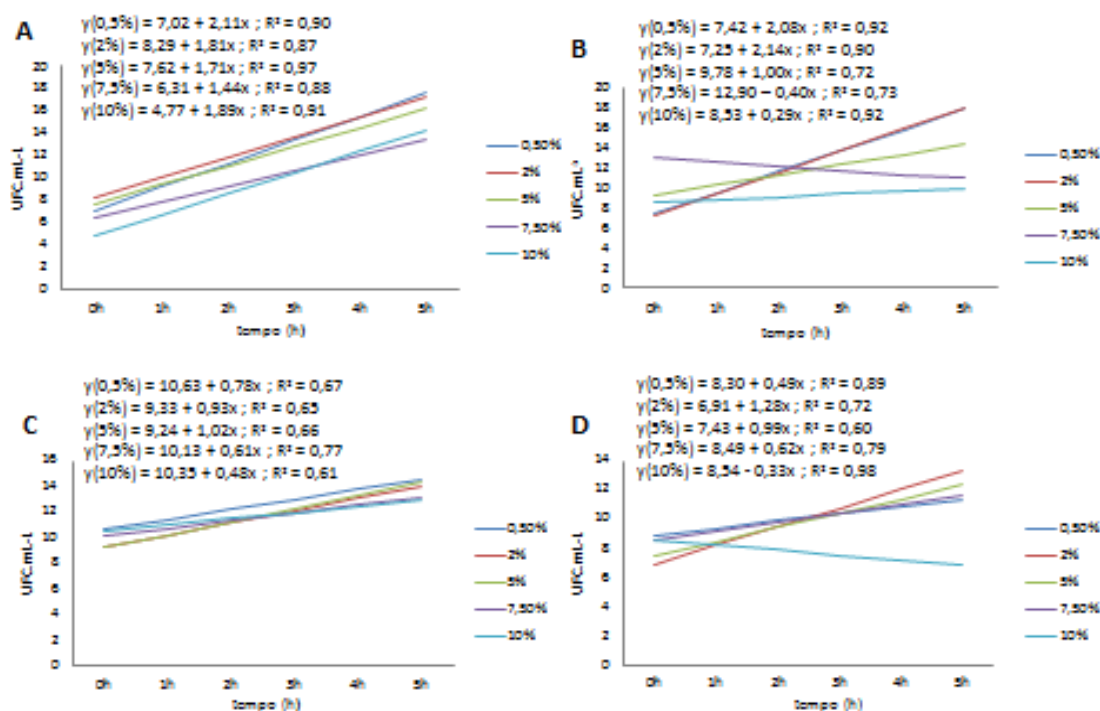


NaCl. Nas concentrações 0,5% e 7,5 a tendência é semelhante onde passam de 10,86 e 10,97 log UFC.mL<sup>-1</sup> (x=4) para 11,35 e 11,59 log UFC.mL<sup>-1</sup> (x=5).

A cepa Nep0315 a partir da concentração de sal 10% já interfere no crescimento da cepa negativamente. Só pelo período de “*over night*” foi suficiente para fazer com que a célula entrasse na fase de declínio, esse fenômeno pode ser explicado pelo efeito antagônico na presença de NaCl na respiração celular das bactérias causando uma deficiência pelo processo de oxidação e produção de energia a partir da matéria orgânica. Segundo, YUAN, et al., (2007), ocorrendo um aumento de condutividade elétrica a concentração salina é maior o qual o micro-organismo é exposto, tendo sua respiração dificultada e seu crescimento é negativo, (figura 1).

Na cepa Nep0115, a 7,5% de NaCl já apresenta uma fase de declínio assim como ocorreu na Nep0315 a 10%, mas para essa cepa 7,5% já foi o suficiente para que o micro-organismo não suportasse tamanha pressão osmótica. Como mostra WONG, et al., (2008) com o aumento da pressão osmótica há um crescimento ascendente na atividade microbiana, porém esse processo ocorre lentamente justamente pelo meio adaptacional.

Figura 1 – Perfil de crescimento das cepas NEP0114 (A), NEP0115 (B), NEP0215 (C), NEP0315 (D) no cultivo in vitro expostas a diferentes concentrações.



#### 4 Conclusão

Tendo em vista os resultados, conclui-se que as bactérias halofílicas podem vir a servir como indicadoras ou de manutenção da atividade microbiana no meio, a fim de permitir a degradação do resíduo antes barrado pela presença de halogênios e pela ausência de bactérias nativas capazes de lidar com esse resíduo agroindustrial salino.





## 5 Referências

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J.G.L.; MIERZWA, J.C.; BARROS, M.T.L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à Engenharia Ambiental**. 2.ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

DODIA, M.S; JOSHI, R.H; PATEL, R.K; SINGH, S.P. **Characterization and stability of extracellular alkaline proteases from halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from saline habitat of coastal Gujarat, India**. Brazilian Journal of Microbiology. V.37. 2006.

FREIRE, R.S; PELEGRINI, R; KUBOTA, L.T; DURÁN, N; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

GIOVANETTI, S. **Resíduos sólidos. Perspectivas e desafios para a gestão integrada**. 1.ed. Recife: EDUFPE, 2014.

JAY, James M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MCINTOSH, D.; FITZSIMMONS, K. Characterization of effluent from an inland, lowsalinity shrimp farm: what contribution could this water make if used for irrigation. **Aquacultural Engineering**. v.27, n.2, p.147-156, 2003.

MONTEIRO, J.H.P; FIGUEIREDO, C.E.M; MAGALHÃES, A.F; MELO, M.A.F; BRITO, J.C.X; ALMEIDA, T.P.F; MANSUR, G.L. **Manual de Gerenciamento Integrado de resíduos sólidos**. Rio de Janeiro: IBAM, 2001.

MUÑOZ, D; MARIN, C. G; MARVAL, H; MARTINEZ, C. **Identificación de bacterias del género vibrio asociadas a zonas productoras de moluscos bivalvos, estado Sucre, Venezuela**. Revista científica FCV-LUZ. Vol.22. n.5. p 459-467, 2012.

VARGAS, A. de B. Responsabilidade sobre geração de resíduos. Disponível em:<[http://ambientes.ambientebrasil.com.br/residuos/programa\\_e\\_projetos/responsabilidade\\_sobre\\_geracao\\_de\\_residuos.html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/residuos/programa_e_projetos/responsabilidade_sobre_geracao_de_residuos.html)> Acesso em Jun de 2015.

YUAN, B.C., LI, Z. Z., LIU, H., GAO, M., ZHANG, Y. Y. **Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions**. Applied Soil Ecology. V.35. 2007.

WONG, V.N.L., DALAL, R.C., GREENE, R.S.B. **Salinity and sodicity effects on respiration and microbial biomass of soil**. Biology and Fertility of Soils. v.44. 2008