

## **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>; MATEUS NAZARI<sup>2</sup>;  
FLÁVIA VOLOSKI ÉRICO KUNDE CORRÊA<sup>2</sup>; LUCIARA BILHALVA CORRÊA<sup>2</sup>;  
ÉRICO KUNDE CORRÊA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [thayliraraujo@gmail.com](mailto:thayliraraujo@gmail.com)

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [rogermarquesea@gmail.com](mailto:rogermarquesea@gmail.com)

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [ericokundecorrea@yahoo.com.br](mailto:ericokundecorrea@yahoo.com.br)

### **1. INTRODUÇÃO**

A geração e destinação de resíduos tem se tornado uma problemática para a sociedade atualmente. Estatísticas relatam que, uma pessoa gera diariamente cerca de 800 gramas de resíduo, como embalagens, papéis, pilhas, alimentos entre outros produtos de consumo (VARGAS, 2015).

Na atividade industrial há uma grande geração de resíduos nocivos ao meio ambiente. Um dos grandes problemas é a emissão de efluentes que promove a contaminação dos corpos hídricos (MONTEIRO, et al., 2001). Nestes resíduos, pode existir 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. Dependendo do teor salino nos efluentes salinos e sua concentração, o número e tipo de organismos afetados variam (MCINTOSH & FIZSIMMONS, 2003).

De fato esse excesso contribui para o desequilíbrio do ecossistema, que procura um estado de equilíbrio dinâmico por meio de mecanismos de autocontrole e autorregulação (BRAGA, et al., 2005). Dessa forma a emissão de efluentes salinos danifica o ciclo biológico natural, atingindo justamente os decompositores (micro-organismos em geral) no final do ciclo, é o caso das bactérias não ocorrendo degradação da matéria-orgânica tendo como problemáticos resíduos industriais ou domiciliares sem tratamento adequado. Tendo em vista esses aspectos, o objetivo desse trabalho foi isolar micro-organismos halofílicos de bacalhau seco salgado, identificando inicialmente o potencial para uma futura aplicação em resíduos salinos.

### **2. METODOLOGIA**

As amostras de bacalhau foram obtidas 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 pH ajustado as faixas desejadas no experimento (Tab 1). Uma alíquota foi transferida para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada 0,1% estéril formando a primeira diluição, levando os tubos à agitação em vórtex por 20s. A partir dos tubos uma alíquota de 1mL foi transferida para as placas de ágar sangue por esgotamento de superfície (aerobiose) e ágar Plate Count Ágar (PCA) em sobrecamada (microaerobiose), método de plaqueamento por meio diferencial. As placas foram incubadas em estufa em diferentes temperaturas de (35, 45, 60°C) por 48h. O experimento foi realizado em duplicata.

Tab 1: Determinação das condições do experimento.

| Amostra               | Variáveis Independentes |                  |                | Variáveis Dependentes                              |
|-----------------------|-------------------------|------------------|----------------|--|
|                       | pH                      | Temperatura (°C) | Oxigênio       |  |
|                       | 4,5                     | 35               |                | GRAM   |
| Bacalhau seco salgado | 7,0                     | 45               | Aerobiose      | Vm-Vp; Citrato, Oxidase; Catalase; Indol; Hemólise |
|                       | 9,5                     | 60               | Microaerobiose |  |

Após o período de incubação foi avaliada a morfologia, coloração das colônias e do ágar. O processo foi repetidas até a obtenção de colônias puras e isoladas, assim iniciando os testes bioquímicos (Vm-Vp, oxidase, catalase, citrato, indol e hemólise) e morfológico (coloração de Gram).

## 2.1. TESTE MORFOLÓGICO

No processo da coloração de Gram as células foram tratadas com cristal violeta (corante primário) e depois tingido com a solução de iodo. Ocorrendo a formação do complexo cristal-violeta-iodo (CV-I) dentro da célula. Em seguida, lavado com etanol, nas bactérias gram-negativas o lipídeo da membrana externa é dissolvido e removido, a célula fica incolor, pois o complexo (CV-I) é removido e a bactéria pode ser corada com o corante de fundo (safranina). Nas bactérias gram-positivas como possuem uma camada de peptideoglicano mais espessa que as gram-negativas, o etanol faz com que os poros do peptideoglicano se contraiam e o complexo corante permaneça no interior da célula (TORTORA, et al., 2012).

## 2.2. TESTES BIOQUÍMICOS

*Teste de Indol* – Uma alçada da cultura pura foi inoculada e incubada em caldo Triptona 1% a 35°C/24h. Transferida uma alíquota desse meio foi adicionado 0,2 a 0,3 mL de reagente Kovacs para cada 4 a 5 mL do caldo Triptona. A formação de anel vermelho-violeta indica teste positivo para indol.

*Teste da Catalase* – Foi preparado um esfregaço das culturas em lâminas, após foi adicionado 1,0 mL de água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% à cultura. Borbulhamento imediato indicou positividade.

*Teste de Citrato* – Com uma agulha de inoculação foi transferido um inóculo leve de cultura para um tubo de ágar Citrato Simmons inclinado, picando o fundo e estriando a rampa, seguindo a incubação a 35°C/96h. A viragem alcalina do indicador de cor verde para azul teste positivo.

*Teste de vermelho de metila e Voges-Proskauer (Vm-Vp)* – Foi inoculado uma alçada da cultura e incubado a 35°C/48h. Teste Vp foi realizado a partir de 1 mL da cultura e consequente adição de 0,6 mL da solução  $\alpha$ -naftol 5%. Logo, adicionado 0,2 mL da solução de KOH 40% e observando a viragem da coloração para rosa, indicando teste positivo.

Para o teste Vm, foi reincubada o caldo Vm-Vp contendo o inóculo por mais 48h, foi adicionado 2,5mL da cultura, 5 gotas da solução de vermelho de metila e observou os resultados, foi observado a viragem imediata do meio para a coloração vermelha indicando teste positivo.

**Teste da Oxidase** – Para o teste da oxidase, uma colônia de cada isolado foi assepticamente transferida para uma tira para teste de oxidase observando viragem do indicador para cor violeta, caracterizando teste positivo.

**Teste da Hemólise** – Esse teste é realizado para identificar a presença de enzimas hemolíticas nos isolados testados, que em caso de positividade, a hemoglobina presente no ágar sangue é degradada e o meio perde coloração vermelha, observando um halo transparente no local de formação da colônia.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes bioquímicos, morfológico dos isolados estão apresentados na (Tab 2).

Tab 2: Resultados do isolamento de bactérias halofílicas obtidos de pescado salgado e seus testes confirmativos.

| VARIÁVEL INDEPENDENTE |                    |     |      | VARIÁVEL DEPENDENTE |         |       |    |    |          |         |          |
|-----------------------|--------------------|-----|------|---------------------|---------|-------|----|----|----------|---------|----------|
| AMOSTRA               | C[O <sub>2</sub> ] | pH  | Temp | Gram                | Citrato | Indol | Vm | Vp | Catalase | Oxidase | Hemólise |
| BACALHAU              | sat                | 4,5 | 35   | Bac+                | ↑+↓-    | -     | -  | +  | +        | +       | -        |
|                       | baixa              | 4,5 | 35   | Bac+                | +       | -     | +  | +  | +        | +       |          |
|                       | sat                | 4,5 | 45   | C+                  | ↑+↓-    | -     | +  | +  | +        | +       | -        |
|                       | baixa              | 4,5 | 45   | C-                  | +       | -     | -  | +  | +        | +       |          |
|                       | sat                | 4,5 | 60   | N                   | N       | N     | N  | N  | N        | N       | N        |
|                       | baixa              | 4,5 | 60   | N                   | N       | N     | N  | N  | N        | N       | N        |
|                       | sat                | 7   | 35   |                     | ↑+↓-    | +     | +  | +  | +        | +       | -        |
|                       | baixa              | 7   | 35   |                     | +       | -     | +  | +  | +        | +       |          |
|                       | sat                | 7   | 45   | Bac+                | +       | +     | -  | -  | -        | -       | -        |
|                       | baixa              | 7   | 45   | N                   | N       | N     | N  | N  | N        | N       | N        |
|                       | sat                | 7   | 60   | N                   | N       | N     | N  | N  | N        | N       | N        |
|                       | baixa              | 7   | 60   | N                   | N       | N     | N  | N  | N        | N       | N        |
|                       | sat                | 9   | 35   | Bac+/Bac-           | ↑+↓-    | +     | +  | +  | +        | -       | -        |
|                       | baixa              | 9   | 35   |                     | +       | -     | +  | +  | +        | -       |          |
|                       | sat                | 9   | 45   | Bac-                | +       | -     | +  | +  | -        | +       | +        |
|                       | baixa              | 9   | 45   | Bac+                | +       | -     | -  | +  | +        | +       |          |
|                       | sat                | 9   | 60   | N                   | N       | N     | N  | N  | N        | N       | N        |
|                       | baixa              | 9   | 60   | N                   | N       | N     | N  | N  | N        | N       | N        |

Foi possível observar que não houve crescimento microbiano nas placas incubadas a 60°C independente das condições de pH e oxigênio no meio. Através da coloração de Gram foi possível identificar apenas um cocos gram negativo e um cocos gram positivo nos isolados a 45°C/pH4,5 por microaerobiose e aerobiose respectivamente nas demais condições foram isolados apenas bastonetes. No meio de cultivo aeróbico teve como positivo as cepas no teste do citrato nas condições de pH9,5 e pH7 a 45°C, as demais cepas se apresentaram positivas na rampa e negativas no fundo do tubo. Ainda por aerobiose, foi constatado teste positivo nas cepas de pH7 a 35/45°C e pH9 a 35°C e nas outras cepas analisadas resultaram teste negativo para indol. Os testes morfológicos e bioquímicos permitiram investigar de uma forma rápida, micro-organismos diferentes conforme relatam (Muñoz, et al., 2012), que encontraram bactérias do gênero *Vibrio* ao avaliar o perfil microbiológico de moluscos no mar da Venezuela. Os isolados obtidos nesse presente estudo

foram possíveis encontrar células em forma de bastonetes, mostrando a relevância do estudo inicial desse trabalho, o que está de acordo com (Lee, et al., 2010), que encontraram micro-organismos de forma de bastonetes resistentes ao estresse em isolados de ostras marinhas.

Já (Figge, et al., 2014) identificaram 3 isolados pertencente ao gênero *Photobacterium*, todos bastonetes gram-negativos, móveis, anaeróbicos facultativos e com capacidade de crescerem em meio de concentração salina de 0,5% a 6% de NaCl, concentrações essa avaliadas nos isolados obtidos em bacalhau seco salgado.

Os cocos encontrados na amostra de bacalhau seco salgado também foram encontrados na carne de sol (Seenayya, 2000), isolados em diferentes concentrações salinas e crescimento com adição de especiarias.

#### 4. CONCLUSÃO

Concluimos que foi possível isolar e verificar 11 cepas diferentes derivadas de uma mesma matriz de bacalhau seco salgado através de testes morfológico e bioquímicos.

#### 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.

FIGGE, M.J; CLEENWERCK, I; UIJEN, A.V; VOS, P; HUYS, G; ROBERTSON, L. **Photobacterium pisciola sp. Nov., isolated from marine fish and spoiled pocked cod**. Syst. Appl. Microbiol, v.37. pag 329–335, 2014.

LEE, H; KIM, M.H; KIM, K. Y; SO, J. S. **Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* ssp. Isolated from the marine oyster (*crassostrea gigas*)**. *Anaerobe*, v.16, 2010.

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

SEENAYYA, M. M. P; **Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt**. Food Research International, v.33. 2000.

TORTORA, G.J; FUNKE, B.R; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 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.