

ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS HALOFÍLICAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO EM RESÍDUOS E EFLUENTES SALINOS

GUILHERME PEREIRA SCHOELER¹; DANIELI SARAIVA CARDOSO²; THAYLI RAMIRES ARAUJO³; MIGUEL DAVID FUENTES GUEVARA⁴; LUCIARA BILHALVA CORRÊA⁵; ÉRICO KUNDE CORRÊA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – gschoeler@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielisc_94@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – thayliraraujo@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – mdavidfuentes@unicesar.edu.co

⁵Universidade Federal de Pelotas – luciarabc@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – ericokundecorrea@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os padrões de industrialização e consumo nos últimos anos favoreceram a crescente geração dos resíduos de modo a influenciar na qualidade do meio ambiente e na vida das pessoas (ROTH; GRACIAS, 2008). A Associação Brasileira de Empresa de Limpeza Pública e Resíduos Especiais (ABRELPE, 2014) aponta que a geração de resíduos sólidos urbanos (RSU) no Brasil em 2013 superou a taxa de crescimento populacional do ano, acarretando em uma situação crítica quanto à gestão dos RSU, ineficiente tanto na coleta seletiva, tratamento e disposição final dos resíduos.

As indústrias, como grandes fontes poluidoras, têm como desafio conciliar a concorrência de mercado junto à preocupação com o meio ambiente através de um sistema sustentável, visto que países em desenvolvimento, como o Brasil, nem sempre estão preparados para o tratamento adequado dos resíduos (SOUZA; SILVA, 1997).

O tratamento consiste nos processos que buscam a transformação do resíduo em um material inerte ou biologicamente estável garantindo a redução do potencial poluidor e descarte em local adequado, incluindo novamente a matéria no ciclo produtivo e ambiental (MONTEIRO, 2001). Nesse sentido, resíduos e efluentes industriais com grande concentração de sal tornam-se um problema, uma vez que a salinidade é um grande empecilho para os tratamentos convencionais (SOUSA, 2009).

A diversidade de população microbiana tem sido essencial no desenvolvimento de novas tecnologias, uma vez que o esgotamento de recursos e necessidade de energia tem aumentado com o passar dos anos (TORTORA et al, 2012).

Dentro da variedade da população microbiana, existem microrganismos denominados de extremófilos, possuem a capacidade de resistência ou desenvolvimento em condições extremas dispostas, que têm despertado interesse na utilização biotecnológica (DODIA et al, 2006), nesse sentido as bactérias definidas como halofílicas são aquelas que possuem a capacidade de se desenvolvem em diferentes concentrações de sal, comumente classificadas como: levemente halofílica (1-3% NaCl), moderadas (3-10% NaCl) e extremas (15-30% NaCl) (BARBOSA, 2005).

Contudo, o objetivo desse estudo foi isolar bactérias halofílicas, a fim de avaliar seu potencial quanto ao crescimento no meio salino, considerando futuras aplicações no tratamento de resíduos e efluentes salinos.

2. METODOLOGIA

Os isolados foram extraídos de amostras de bacalhau seco salgado, adquiridas no comércio local de Pelotas, analisadas no Núcleo de Extensão, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade (NEPERS) através de cultivo in vitro, testes bioquímicos, morfológico e estatístico.

Determinaram-se dois isolados que foram aplicados aos testes bioquímicos (Citrato, Indol, Vm/Vp, Catalase, Oxidase) e morfológicos (coloração de Gram) seguindo a metodologia conforme o *Compendium of Methods for Microbiological Examination* MORTON (2001).

Para o cultivo in vitro, cada isolado foi transferido com auxílio de uma alça para tubos de ensaio contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e cloreto de sódio (NaCl) em diferentes concentrações (0,5%, 2%, 5%, 7,5%, 10%) incubados por um “overnight” em estufa a 35°C. Em seguida foi transferido 10 mL de cada tubo, nas diferentes concentrações de sal do BHI com os respectivos inóculos, para um erlenmeyer contendo 190 mL de caldo BHI esterilizado com as mesmas concentrações de NaCl, sendo incubados por 35°C durante 5 horas em uma incubadora com agitação orbital, Shaker (Lactea®), a 100 rpm, iniciado o processo de fermentação.

A cada hora da fermentação foram retiradas alíquotas de 1mL de cada erlenmeyer e transferida para tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1% e agitado em vórtex. Para a Contagem Padrão de Placas foi utilizada a técnica de esgotamento de superfície com 3 diluições consecutivas, transferindo 0,1 mL de cada tubo para uma placa contendo meio Plate Count Agar (PCA) incubadas a 35° por 24 horas.

O processo de cultivo in vitro seguiu delineamento casualizado com três repetições em arranjo bifatorial, seguindo primeiro fator o tempo de fermentação em horas (0; 1; 2; 3; 4; 5) e o segundo a concentração de NaCl (0,5; 2; 5; 7,5; 10%), os dados obtidos foram analisados por Análise de Variância a 95% de confiança. Ocorrendo significância estatística, os dados foram avaliados por Regressão Linear com ajustes a modelos polinomiais, conforme a equação 1.

$$y = y_0 + ax \quad (1)$$

Onde, “y” é a concentração de colônias (log. UFC.mL⁻¹), “y₀” e “a” são constantes do modelo e “x” é o tempo do processo em horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os resultados dos testes bioquímicos e morfológico (tabela 1), foi possível observar que tanto o isolado A quanto o isolado B se classificam como bacilos gram-positivos. TORTORA (2012) aponta que o teste de coloração de Gram revela a forma celular e a estrutura básica do microrganismo, bactérias gram-positivas são aquelas que formam um cristal violeta-iodo (CVI), o qual faz com que a coloração roxa permaneça na célula enquanto nas gram-negativas este complexo CVI não ocorre.

Tabela 1 – Resultado dos testes bioquímicos e morfológico

Amostra	Teste						
	Gram	Citrato	Indol	Vm	Vp	Catalase	Oxidase
Isolado A	bacilo+	+	+	-	-	-	-
Isolado B	bacilo+	+	-	-	+	+	+

Para o teste do citrato os dois isolados apresentaram-se positivos, utilizando o citrato como única fonte de carbono, os mesmos mostraram-se negativos para o teste Vm, assim não degradando a glicose em ácidos mistos (VIEIRA; FERNANDES, 2012).

Nos testes Vp, catalase e oxidase realizados para o isolado A obtiveram resultados negativos, não apresentando enzimas capazes de degradar moléculas complexas, enquanto para o isolado B os testes foram positivos. A capacidade de degradar o aminoácido triptofano, através do teste Indol, foi positiva para o isolado A e negativa para o isolado B (VIEIRA; FERNANDES, 2012).

O crescimento dos isolados em cultivo in vitro através da fermentação não alimentada está representado pela Figura 1.

O isolado A apontou concentração celular inicial de fermentação ($x=0$) de 7,02; 8,29; 7,72; 6,31 e 4,77 log UFC.mL⁻¹ respectivamente para as cinco concentrações salinas (0,5%, 2%, 5%, 7,5%, 10%) avaliadas. A concentração máxima celular foi observada na salinidade 0,5% chegando a 17,57 log UFC.mL⁻¹, apesar de apresentar a menor taxa de crescimento na concentração 10% de NaCl o isolado chegou a 14,22 log UFC.mL⁻¹ em 5 horas. Nesse sentido, a taxa de crescimento do isolado A manteve a mesma tendência durante as diferentes concentrações salinas na fermentação analisada.

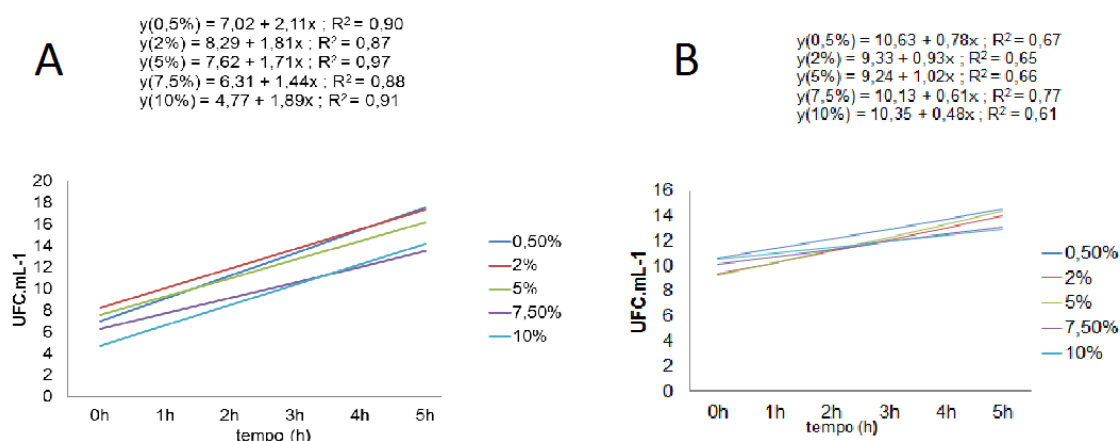


Figura 1 – Gráficos da fermentação não alimentada dos isolados A e B

Para o isolado B, houve crescimento durante todo processo de fermentação, no final do processo ($x=5$) o crescimento na concentração 0,5% de NaCl atingiu 14,53 UFC.mL⁻¹ e para a concentração de 10% de sal foi 12,90 UFC.mL⁻¹. Para a concentração celular inicial, 5% resultou em 9,24 log UFC.mL⁻¹, menor valor quando comparado as outras concentrações, em contraponto, no decorrer no período o isolado apresentou melhor desenvolvimento chegando a 14,34 log UFC.mL⁻¹.

Isolados com as características semelhantes a A e B, foram avaliados por outro estudo quanto seu crescimento em até 24 horas em concentrações salinas de até 15%, nesse período permaneceram em sua fase de crescimento exponencial após isso entraram em fase estacionária de crescimento (DODIA et al, 2006).

O comportamento avaliado de crescimento dos isolados A e B, apresentaram não ser afetado negativamente quanto as concentrações salinas avaliadas, caracterizando A e B como no mínimo halófilicas moderadas, por se desenvolverem até 10% de NaCl (BARBOSA, 2006).

4. CONCLUSÕES

Através dos testes realizados, foi possível verificar a resistência e desenvolvimento dos isolados A e B no meio salino, classificando as mesmas como bactérias halofílicas, assim os dados experimentais confirmam futuros testes destes microrganismos no tratamento de resíduos e efluentes salinos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRELPE. Associação Brasileira de Empresa de Limpeza Pública e Resíduos Especiais. **Panorama dos Resíduos Sólidos no Brasil**. Acesso em: 01 de agosto de 2016. Online. Disponível em: <http://www.abrelpe.org.br/Panorama/panorama2014.pdf>

BARBOSA, D. C. **Identificação de bactérias halofílicas/halotolerantes com potencial uso no tratamento de água de produção**. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Curso de Processamento, Gestão e Meio Ambiente na Indústria do Petróleo e Gás Natural, UFRJ.

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**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 276-282, 2006.

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

MORTON, R. D. **Compendium of Methods for Microbiological Examination**. 4 ed. Washington: APHA, 2001.

ROTH, C. G.; GARCIAS, C. M. A influência dos padrões de consumo na geração de resíduos sólidos dentro do sistema urbano. **Revista Redes**, Santa Cruz do Sul, v. 13, n. 3, p. 5-13, 2008.

SOUSA, M. R.; SILVA, R. J. **A geração de resíduos industriais e sua destinação final**. Associação Brasileira de Engenharia de Produção, Rio de Janeiro, 1997. Acesso em 6 agosto 2016. Online. Disponível em: http://www.abepro.org.br/biblioteca/enegep1997_t6501.pdf

SOUSA, M. A. S. B.; MELO, J. L. S.; MELO, H. N. S.; BORGES, M. C.; NUNES, A. O. **Gerenciamento de Resíduos Salinos da Destilação Solar**. 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo, 2009. Acesso em 7 agosto 2016. Online. Disponível em: <http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/4a/5/M.%20A.%20S.%20B.%20Souza%20-%20Resumo%20Exp.pdf>

TORTORA, G. J. FUNKE, B. R. CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 10.ed.

VEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Geral**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. Cap. 8, p. 87-96.