

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

“Aplicação de *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*, isolados de bacalhau seco salgado (*Gadus* sp), no tratamento de resíduos sólidos agroindustriais salinos por compostagem controlada”.

Thayli Ramires Araujo
Bacharel em Química Industrial

Pelotas, 2018.

Thayli Ramires Araujo

“Aplicação de *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*, isolados de bacalhau seco salgado (*Gadus* sp), no tratamento de resíduos sólidos agroindustriais salinos por compostagem controlada”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área do conhecimento: Microbiologia de Alimentos).

Orientador: Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa

Coorientador: Dr. Roger Vasques Marques

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

A111a Araujo, Thayli Ramires

"Aplicação de *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*, isolados de bacalhau seco salgado (*Gadus sp*), no tratamento de resíduos sólidos agroindustriais salinos por compostagem controlada / Thayli Ramires Araujo ; Erico Kunde Correa, orientador ; Roger Vasques Marques, coorientador. — Pelotas, 2018.

66 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Inóculo. 2. Resíduo salino. 3. Halotolerante. 4. Halofílicas. I. Correa, Erico Kunde, orient. II. Marques, Roger Vasques, coorient. III. Título.

CDD : 664

Thayli Ramires Araujo

“Aplicação de *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*, isolados de bacalhau seco salgado (*Gadus* sp), no tratamento de resíduos sólidos agroindustriais salinos por compostagem controlada”.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Eduarda Hallal Duval
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Roger Vasques Marques
Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Deborah Murowaniecki Otero.
Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande.

Dedico aos meus pais João Carlos Araujo e
Maria do Carmo Ramires por nunca terem
medido esforços por mim e serem sempre os
incentivadores para eu seguir em frente por
mais que tenha tropeços no caminho.

“Para ter sucesso, é necessário amar de verdade o que se faz”.

Steve Jobs

Agradecimentos

Ao título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos agradeço a minha família pelo total incentivo para dar seguimento aos estudos e apoio a profissão que escolhi. Agradeço a todos que estiveram comigo nos momentos bons e de felicidade e principalmente àqueles que quando tropecei e cai me estenderam a mão para levantar e seguir em frente.

Ao meu pai, João Carlos Araujo, o meu imensurável obrigada, por tudo, pelos conselhos, pelos abraços, pelas palavras de forças, pelo apoio financeiro e por ser um pai tão presente e preocupado com o meu futuro. Agradeço sempre por seres meu pai e estares participando dessa caminhada comigo, “pobreziinhoo” eu te amo muito!!!

Às minhas “lindas” da vida, mãe e vó que a todas as etapas vencidas ficam com aquele olhar de felicidade e orgulho que têm de mim, sem o amor de vocês, educação e lições de vida eu não seria nada. Obrigada por serem um dos meus portos seguros.

Ao meu padrasto, o meu segundo pai, o meu muito obrigado! Foste essencial na minha educação e um dos maiores incentivadores para seguir em frente e buscar as realizações dos meus sonhos.

In memoriam ao meu vô também dindo, por me proteger sempre, um ano longe de ti, mas o sinto comigo sempre! Sei que estás em pulos de alegria aí no céu, obrigada por toda a sua proteção e amor!

Agradeço, a todos da minha família que torcem para o meu futuro e por minhas conquistas, a todos, obrigada pelo apoio e pelo carinho.

A todo grupo do laboratório Núcleo de Educação, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade (NEPERS) por fazerem parte de todo essa realização, apoio e coleguismo. Aqueles principalmente que se tornaram amigos como: Nicole Fernandes, Carolina Gonçalves, Matheus da Paz, Gabriel Martins, Mateus Nazari, Guilherme Schoeler, Miguel Fuentes, Pamela Cabral, Giulia Verruck, Bruna Irion, Pablo Mendes colegas e amigos que estiveram comigo em todo esse processo de evolução.

Aos amigos Thaís Brasil, Edson Rocha e Tales Brasil pelo apoio e pela amizade nesse último ano do mestrado.

Aos professores responsáveis pelo laboratório ao qual desenvolvi a pesquisa de mestrado, Luciara Bilhalva Corrêa e Érico Kunde Corrêa, ensinando-me a evoluir na pesquisa e a desempenhar a função da docência. O meu muito obrigada!

Aos amigos Roger Vasques Marques, Guilherme Medeiros, por aguentarem todos os meus choros, por terem cedido um ombro amigo/irmão, por me fazerem erguer a cabeça e seguir em frente e por me fazerem sorrir e dar gargalhadas. Vocês estarão sempre no meu coração! Amo-os.

Ao que escolhi como irmão, Alexandre Lorini, agradeço a cada minuto de companhia que fizeste, a cada aventura que passamos nesses 2 anos e ao carinho que tivesse com a minha família, faço minha família tua também. E obrigada por ser o dindo presente da minha pequena Aurora.

Não poderia esquecer de agradecer à minha cachorrinha Aurora, minha princesa por fazer parte desse meu último ano de mestrado, por ter sido a melhor coisa na minha vida, por me ajudar a vencer a depressão e por ser tão amorosa e meiga. Te amo!

Agradeço ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), em especial à professora Eduarda Duval Hallal, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LabMicro), em especial ao professor Wladimir Padilha e Tassiana Ramires, pelo espaço concedido e a boa vontade de auxiliar no andamento da minha pesquisa e as meninas que lá desempenham suas pesquisas por serem tão receptivas.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem a contribuir nesse trabalho.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de executar este trabalho.

A todos que de uma forma ou de outra me auxiliaram e torceram pela realização desse sonho, meu muito obrigada!

RESUMO

Araujo, Thayli Ramires. “**Aplicação de *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*, isolados de bacalhau seco salgado (*Gadus* sp), no tratamento de resíduos sólidos agroindustriais salinos por compostagem controlada.**” 2018. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A atividade das agroindústrias tem causado impactos ao meio ambiente, dentre eles a contaminação de solo, águas subterrâneas e superficiais, atmosfera. Na indústria de alimentos o sal é utilizado em diversas etapas de processamento de alimentos, e também é considerado o ingrediente mais consumido pelos humanos. Na indústria pesqueira marítima o sal está presente desde a descarga de material e o efluente gerado quando tratado origina o chamado lodo de estação de efluentes de pescado salgado, esse resíduo lançado ao meio ambiente sem tratamento acarreta sérios problemas ambientais, tais como a inibição da microbiota natural do meio afetando o ciclo biogeoquímico. Uma das ferramentas para o tratamento desse resíduo salino é o processo de compostagem, que pode ser aplicada no tratamento de diversos resíduos sólidos agroindustriais. Uma questão a ser discutida é a presença de sal nesse resíduo. A pressão osmótica provoca a inibição do crescimento (atividade) da microbiota natural podendo levá-la a morte por extravasamento do conteúdo celular. Para solucionar esses problemas apresentados, a adição de cepas halofílicas e/ou halotolerantes seria uma alternativa para que ocorra a compostagem desse resíduo salino. Portanto, um dos objetivos desse trabalho foi isolar e identificar por PCR bactérias halofílicas de uma matriz alimentar salgada como o bacalhau seco salgado. Os resultados demonstraram que as cepas *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus spp* foram as mais promissoras quando submetidas a multiplicação bacteriana em caldo suplementado com 7,5% de NaCl. Outro objetivo deste trabalho constituiu em avaliar através de parâmetros físico-químicos a microcompostagem da mistura de lodo de pescado salino, casca-de-arroz e serragem com a adição de *B. cereus*, *E. faecalis* e consórcio delas nos dias de processo de compostagem. Os resultados demonstraram eficácia na queda da condutividade elétrica no período estudado pelas cepas utilizadas nos tratamentos. O pH apesar de ter apresentado queda durante a compostagem se manteve acima de 6, padrão estabelecido pela legislação brasileira para comercialização do composto. Durante todo o período de compostagem, o teor de nitrogênio encontrado permaneceu em porcentagens baixas, devido ao uso de bactérias halotolerantes, apesar de serem utilizadas como probióticas causam a desnitrificação, assim elevando o percentual de nitrogênio no decorrer do experimento. Em relação ao carbono a porcentagem de carbono teve uma queda insignificativa durante o processo, a porcentagem de carbono encontrada durante o experimento é respondido pela alta atividade microbiana obtido em porcentagens de carbono abaixo dos 45% ao final dos 26 dias de incubação. A umidade para os tratamentos com adição de probióticos estiveram dentro do padrão estipulado pelo MAPA, entre 40 e 60%, contrariamente dos tratamentos sem os inóculos que apresentaram valores acima. E a matéria mineral, apresentou valores maiores ao final da compostagem devido a ação microbiana e a redução da matéria orgânica e formação de minerais. O lodo de pescado salino de estação de tratamento de

efluentes obteve melhores resultados com adição de inóculo, como adição de outro resíduo rico em nitrogênio, modificação de volume/volume e material estruturante, e maior tempo de compostagem. Apesar dessas observações os resultados apresentados foram dentro dos padrões da legislação brasileira.

Palavras-chave: Inóculos, resíduo salino, halotolerante, halofílicas.

ABSTRACT

Araujo, Thayli Ramires. 2018. 66f. **“Application of *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis*. strains isolated from salted dry cod (*Gadus* sp.) in the treatment of saline agroindustrial solid waste by controlled microcomposting”**. Dissertation (MSc in Food Science and Technology) – Postgraduate Program in Food Science and Technology , Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, 2018.

The activity of the agroindustries has caused impacts to the environment, among them the contamination of soil, groundwater and surface, atmosphere. In the food industry, salt is used in several stages of food processing, and is also considered the most consumed ingredient by humans. In the marine fishing industry salt is present since the discharge of material and the effluent generated when treated gives rise to so-called salty fish effluent seasoning, this waste released to the environment without treatment causes serious environmental problems such as the inhibition of the microbiota natural environment affecting the biogeochemical cycle. One of the tools for the treatment of this saline residue is the composting process, which can be applied in the treatment of various agroindustrial solid wastes. One issue to be discussed is the presence of salt in this residue. The osmotic pressure causes the inhibition of the growth (activity) of the natural microbiota and can lead to death by extravasation of the cellular content. To solve these problems, the addition of halophilic and / or halotolerant strains would be an alternative for the composting of this saline residue. Therefore, one of the objectives of this work was to isolate and identify, by PCR, halophilic bacteria from a salt food matrix such as salted dry cod. The results showed that the *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus spp* strains were the most promising when submitted to bacterial multiplication in broth supplemented with 7.5% NaCl. Another objective of this work was to evaluate the microcompaction of the sludge mixture of saline fish, rice husk and sawdust with the addition of *B. cereus*, *E. faecalis* and their consortium in the days of the composting process. The results demonstrated efficacy in the reduction of the electrical conductivity in the period studied by the strains used in the treatments. The pH, even though it showed a drop during composting, remained above 6, a standard established by the Brazilian legislation for the commercialization of the compost. During the whole composting period, the nitrogen content remained low, due to the use of halotolerating bacteria, although they are used as probiotics, causing denitrification, thus raising the percentage of nitrogen during the experiment. In relation to carbon the percentage of carbon had an insignificant drop during the process, the percentage of carbon found during the experiment is answered by the high microbial activity obtained in carbon percentages below 45% at the end of the 26 days of incubation. The humidity for the treatments with addition of probiotics were within the standard stipulated by MAPA, between 40 and 60%, contrary to the treatments without the inocula that presented values above. And mineral matter presented higher values at the end of composting due to microbial action and reduction of organic matter and mineral formation. The saline fish sludge from the effluent treatment station obtained better results with addition of inoculum, as addition of another residue rich in nitrogen, modification of volume / volume and structuring material, and greater time of composting. Despite these observations, the results presented were within the Brazilian legislation.

Key words: Inoculum, saline residue, halotolerant, halophilic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivo específico	16
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1. Desafio ambiental	16
3.2. Resíduos e efluentes salinos	17
3.3. Bactérias halofílicas.....	18
3.4. Matriz analítica	19
3.5. Compostagem	20
3.5.1. <i>Bacillus cereus</i>	21
3.5.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	22
4. Capítulo I – Artigo I	23
5. Capítulo II – Short Communications	36
6. REFERÊNCIAS.....	51
Apêndices	62

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos nas últimas décadas tem crescido vertiginosamente, consequência do crescimento populacional e do elevado padrão de vida. Segundo a Organização das Nações Unidas (2017) a população mundial chegará a 9,8 bilhões em 2050 e em 2100 superará o número de 11,2 bilhões de pessoas. Com esse aumento populacional surge a necessidade de aumentar a produção de insumos para suprir valores nutricionais essenciais do ser humano, desse modo, são necessários investimentos em alimentos processados, carnes, laticínios, entre outros. Por conseguinte, as indústrias de alimentos passam por atualizações de uso de tecnologias e metodologia de produção para cumprir com as exigências de mercado. Sendo responsável por utilizar em larga escala os recursos naturais e atingindo negativamente o meio ambiente não somente pela o uso de recursos naturais como a emissão descomedida de resíduos líquidos e sólidos passíveis ao meio ambiente, resultado das etapas de processamento industrial.

As atividades das indústrias de alimentos utilizam diversos insumos, em destaque os sais, condimentos de maior uso nos diversos processos de conservação e produção de alimentos e na mesa do consumidor. Os sais podem estar presente tanto no efluente quanto no lodo e essa presença afeta diretamente o desenvolvimento da biota natural, evitando a multiplicação celular e inibindo sua atividade enzimática pela pressão osmótica. Os microrganismos naturais em alta pressão osmótica manifestam suas deficiências perante a presença de sal, pois seu sistema bioquímico não é munido de mecanismo osmorregulador, ocorrendo muitas vezes sua morte ou inibição por desequilíbrio osmótico. Por esse motivo o sal é um dos aditivos utilizados nos processos agroindustriais para conservação de alimentos (MELIÁN-MARTEL et al., 2011).

Um dos tratamentos utilizados para resíduos sólidos agroindustriais é a compostagem. Apesar de ser uma técnica secular, a compostagem demonstra eficiência nas suas etapas (bioestabilização e humificação) quando bem administrada. Esse processo propõe a reciclagem de nutrientes por degradação da matéria orgânica heterogênea por ação microbiana (decompositores), transformando um material antes prejudicial ao meio ambiente em um composto de alto valor à agricultura. Na compostagem, ocorrem transformações de materiais complexos de natureza bioquímica em materiais de cadeia simples por ação de microrganismos

que já estão inseridos nesse meio. A presença de sal nos resíduos sólidos pode interferir no metabolismo dos microrganismos afetando a fase termofílica, etapa essencial para que ocorra a decomposição de xenobióticos e eliminação de patogênicos. Ao final do processo, os produtos obtidos são dióxido de carbono, água, calor e matéria orgânica compostada (composto maturado) (HUANG et al., 2017).

Uma alternativa para o tratamento de resíduos sólidos salinos, por compostagem, é a utilização de microrganismos resistentes (halotolerantes) ou que requerem altas concentrações de sal para o seu desenvolvimento (halofílicos). Os microrganismos halofílicos podem ser classificados de acordo com sua necessidade de sal para o seu desenvolvimento, possuem em seu sistema bioquímico proteínas que os capacitam para obter o equilíbrio osmótico, também chamado de sistema osmorregulador. Enquanto as bactérias halotolerantes crescem na presença ou ausência de NaCl (BOUGOUFFA et al., 2014).

Estudos realizados referentes a aplicação de inóculos, cepas comerciais ou de estoque laboratorial, em compostagem, constataram que é possível ter uma otimização no processo de compostagem com aplicação de inóculos. Os inóculos aplicados auxiliaram a degradação da matéria orgânica e modificaram características do composto final, melhorando sua qualidade. A adição de microrganismos beneficia a qualidade do produto final e durante o período de compostagem altera a dinâmica da microbiota, elevando a biocomplexidade (CORRÊA et al., 2008; VICENTINI et al., 2009).

A compostagem por ser um processo de degradação de matéria heterogênea, pode ser utilizado diversos materiais ricos em carbono e nitrogênio oriundos da atividade agroindustrial. A casca-de-arroz, resíduo do beneficiamento de arroz e de baixo valor comercial é utilizada como material estruturante e substrato de compostagem rico em carbono para microrganismos envolvidos na compostagem (VALENTE et al., 2016), a serragem é outro material rico em carbono comumente utilizado na compostagem como material estruturante e absorvente de resíduos úmidos (VALENTE et al., 2016; WON et al., 2016). Esses materiais ricos em carbono são homogêneos e associados aos resíduos ricos (lodo, cama de aviário, dejetos de animais entre outros).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo aplicar bactérias halotolerantes resistentes a elevada concentração salina, para o tratamento de resíduo sólido salino de uma indústria pesqueira por microcompostagem controlada.

2.2. Objetivo específico

- Identificar e isolar bactérias halofílicas e/ou halotolerantes de bacalhau, que apresentem crescimento em concentração salinas de 7,5% de NaCl.
- Sequenciar os isolados pela técnica da PCR.
- Aplicar a microcompostagem como tratamento de lodo de uma estação de tratamento de efluentes da indústria pesqueira, com diferentes culturas halotolerantes iniciadoras.
- Definir as condições ideais para degradação de lodo de estação de tratamento de efluentes e sua transformação em fertilizante, conforme a legislação pertinente.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Desafio ambiental

O aumento desenfreado da população está relacionada com a elevada atividade das indústrias de alimentos, essas atividades têm-se intensificado para atender a demanda exigida pelo mercado e as necessidades primordiais do ser humano. Contudo, o aumento de produção acaba gerando em demasia resíduos orgânicos causando impactos negativos ao meio ambiente (PIZARRO et al., 2016).

Os resíduos sólidos gerados pelos processos agroindustriais são muitos, e dependem do tipo de indústria, o bagaço, restos de frutas e hortaliças, resíduos de indústrias de processamento de carnes (vísceras, carcaças de animais), curtumes (lodo do processamento), da celulose (madeira, lodo do processamento), indústrias de pescado (pedaços de pescado, escamas, pele, vísceras), criadouros de aves, suínos, entre outros.

A Política Nacional dos Resíduos Sólidos define resíduos sólidos, como qualquer bem descartado que seja de origem das atividades antropológicas, incluindo gases comedidos em recipientes, efluentes que se tornam inviáveis o lançamento destes em qualquer corpo hídrico sem o devido tratamento (BRASIL, 2010).

As indústrias devem por sua vez exercer a responsabilidade ambiental para com o futuro do meio ambiente. Os problemas ambientais hoje relatados podem ser resultados das atividades industriais do passado que com o passar do tempo foram afetando o ambiente. Para a minimização e conscientização ambiental faz-se necessário uma gestão adequada para avaliação dos resíduos gerados do setor e desenvolver uma política de processamento e de gestão de resíduos.

Um dos planos gestores mais conhecidos no setor industrial é o “3R”, assim chamado por tratar de três atividades relacionadas a geração de resíduos, reduzir, reutilizar e reciclar. Redução está relacionada em reduzir o uso dos recursos naturais, como energia e água, refletindo ainda na economia de recursos financeiros e preservação da natureza. Reutilização, define-se como reaproveitamento de tudo que foi possível de cada etapa do processamento, como reutilização de água e elaboração de coprodutos. E por fim, reciclagem, definida como reciclo de um resíduo ou um tratamento de baixo custo para o que é gerado de resíduo, como compostagem para reciclagem da matéria orgânica, digestão anaeróbia (tratamento de efluentes em biodigestores) para geração de biogás ou eletricidade (PARRY et al., 2013; LI et al., 2015).

3.2. Resíduos e efluentes salinos

O sal (NaCl) é utilizado em diversas práticas industriais, principalmente em processos químicos na produção de pesticidas, fungicidas, entre outros. É o principal reagente a ser utilizado no processo de amaciar água dura através de permuta iônica sequestrando cátions de Ca^{+2} e Mg^{+2} (LEFEBVRE et al., 2005).

Os resíduos salinos normalmente são tratados por processos físico-químicos pois a ação microbiana nesses casos é ineficaz já que a presença de sais inibem sua atividade metabólica por não possuir um sistema osmorregulador (MELIÁN-MARTEL et al., 2011).

Na indústria de alimentos o sal é utilizado no processamento de produtos cárneos, conservas de legumes, produtos lácteos, pescado na etapa de processamento e na conservação de alimentos em geral. A maior fonte de resíduo salino gerado na indústria de conservas de vegetais está relacionada com a utilização da salmoura nas etapas de decapagem e conserva. Na indústria de pescado esse resíduo salino já está presente desde a chegada da matriz a indústria, gerando resíduos ricos em sal, matéria orgânica e nitrogênio proteico (DIAZ et al., 2002; LEFEBVRE & MOLETTA, 2006).

Devido as diversas atividades as quais o NaCl pode ser aplicado para auxiliar o processamento de alimento, é importante desenvolver tecnologias como alternativa do tratamento desse resíduo salino gerado.

3.3. Bactérias halofílicas

As bactérias são seres vivos microscópicos, unicelulares e procariontes, podem apresentar morfologia de cocos, bacilos, espirilos, estrela, quadrada. Podem ser arranjadas em pares, cadeias ou grupos dependendo do gênero apresentado. As bactérias não possuem sexo e sua forma de reprodução é por fissão binária, uma célula mãe origina duas células filhas de material genético idêntico. Podem apresentar mobilidade através de flagelos e suas características de parede celular dividem ainda essas bactérias em gram positivas ou gram negativas (TORTORA et al., 2012).

Bactérias halofílicas são microrganismos que habitam ambientes extremos, ou requerem presença de sal para seu desenvolvimento. As bactérias podem ser classificadas de acordo com a sua tolerância a salinidade, halofílicas moderadas necessitam de 5-20% de sal e as halofílicas extremas que se desenvolvem de 20-30% de sal. As bactérias halofílicas integram o domínio Archaea, filo Euryarchacota, Classe Halobacteria, e estão distribuídas em 29 gêneros, apresentam morfologia de cocos ou bacilos, são sensíveis a pH baixo, integram o grupo dos neutrófilos e alcalófilos e toleram temperaturas altas temperaturas. Enquanto bactérias halotolerantes são microrganismos que são capazes e se desenvolverem em ambientes salinos, porém não necessitam da presença de sal para o seu desenvolvimento (SALLOTTO et al., 2012).

As bactérias halofílicas e as halotolerantes também se destacam pelo seu sistema bioquímico, ao contrário da maioria dos microrganismos, elas conseguem se desenvolver em atividade de água de até 0,75. Através da estratégia *salt-in* conseguem manter o equilíbrio osmótico intracelular por concentrações de íons de potássio no citoplasma (BOUGOUFFA et al., 2014).

Embora as bactérias halofílicas sejam datadas há milhões de anos, na atualidade estão sendo utilizadas na aplicação biotecnológicas devido a sua tolerância e resistência em situações desfavoráveis para seu desenvolvimento.

Segundo Chandrasekaran et al. (2017), resíduos salinos são lançados diariamente ao meio ambiente prejudicando o ecossistema natural. Resíduos de refinaria de petróleo, indústria têxtil, couro, pesticidas, fabricação de corantes são exemplos de resíduos salinos. A microbiota natural é incapaz de reagir contra esses tóxicos lançados, por esse motivo o uso de microrganismos halofílicos e halotolerantes resistentes a essas condições extremas no tratamento desses resíduos salinos, podem ser uma alternativa viável para evitar ou reduzir a poluição ambiental causada por tais atividades, da forma que agem na degradação de aromáticos hidrocarbonetos.

Na indústria de alimentos, os microrganismos halofílicos estão sendo utilizados na bioconservação de frutos pós-colheita. Estudos realizados constataram que através das enzimas extracelulares de algumas bactérias agiram como fungicida biológico, capacitado na substituição dos fungicidas sintéticos (ESSGHAIER et al., 2009; SADFI-ZOUAOUI et al., 2008).

3.4. Matriz analítica

O bacalhau *Gadus morhua*, é um peixe oriundo dos mares, usualmente comercializado sob a forma de pescado seco salgado por processo de salga para conservar suas propriedades nutricionais. Esse pescado é aceito ao paladar do consumidor, de grande importância histórica na pesca, seu habitat natural são as águas frias do mar Atlântico do Norte, e por ser uma espécie migratória pode ser encontrado desde as plataformas continentais até costas (KARLSEN et al., 2013).

Existem cinco tipos de bacalhau: o legítimo bacalhau (*Gadus Morhua*) considerado o mais nobre para uso na alta gastronomia; o bacalhau *Macrocephalus*, também conhecido como bacalhau do Pacífico por habitar as águas do Pacífico,

suas características são semelhantes ao legítimo bacalhau, mas podem ser diferenciados pelas barbatanas e pela coloração da nadadeira caudal esbranquiçada. O *Saithe* é o peixe mais vendido no nordeste brasileiro, ele é apetitoso e de cor escura; *Ling* é o peixe mais afilado dos cinco, porém sua carne é saborosa e de coloração clara; *Zarbo* é o menor dos peixes considerados bacalhau, sua carne é clara e propícia para a alimentação, apesar de não ser o peixe mais nobre ele é requisitado pelos chefes da gastronomia para produção de seus pratos (FILHO et al., 2004).

Além dos cinco tipos de bacalhau eles podem ser classificados em três categorias, dependendo do corte e da conservação do pescado, são imperial, universal ou popular. Imperial é o bacalhau curado, escovado e limpo, considerado Porto Imperial. A categoria universal é considerado o pescado que apresenta alguns defeitos em sua aparência devido ao manejo, podendo afetar a qualidade da carne, e o popular é considerado o peixe que apresenta grandes defeitos em sua aparência, como manchas na carne e pedaços faltando da peça (FERREIRA, 2014).

3.5. Compostagem

A compostagem é definida como um processo controlado de degradação da matéria orgânica heterogênea por ação microbiana (decompositores) em meio aeróbio, os resíduos são degradados em compostos mais simples. A compostagem ocorre em duas etapas: bioestabilização e humificação, além de várias fases. A bioestabilização é a etapa inicial do processo, composta pela fase mesófila nos primeiros dias onde ocorre a metabolização de compostos mais simples e proliferação de microrganismos decompositores. Em um segundo momento a fase termófila se inicia e temperaturas de 60 °C são usualmente observadas. Nessa fase alguns, xenobióticos são degradados, microrganismos patogênicos são eliminados e a decomposição da matéria orgânica é mais acentuada. Essa fase pode perdurar alguns dias ou até meses dependendo da característica do material a ser compostado. Após essa fase, a temperatura tende a cair, obtendo-se um composto semicurado, iniciando a etapa de humificação em temperaturas mais amenas e um período prolongado para realizar o processo de maturação do composto. Ao fim desse processo é obtido um composto de qualidade e de coloração escura levemente porosa. Durante todo o processo de compostagem ocorre liberação de

dióxido de carbono, vapor de água, liberação de calor e geração de energia pela atividade microbiana. O reciclo de nutrientes que ocorre na compostagem é de responsabilidade da microbiota comensal dos resíduos utilizados. Apesar disso, estudos estão sendo realizados sobre a adição de complexos de microrganismos aplicados na compostagem agindo como probióticos, enriquecendo a qualidade do composto final de forma química (CORRÊA et al., 2008; HUANG et al., 2017; GUIDONI et al., 2018).

Quando o processo de compostagem é bem realizado é obtido um composto de alto valor agregado, tanto para o solo quanto para o produtor. De maneira geral, o uso de resíduos vegetais, esterco de criadouros, alguns resíduos de animais, maravalha, casca-de-arroz, serragem, lodo de estação de tratamento, farinha de osso, entre outros como componentes da compostagem. Esses materiais devem conceder aporte nutricional para os microrganismos agirem no processo, havendo algumas exigências físico-químicas e biológicas para que isso ocorra, como equilíbrio da reação carbono-nitrogênio, aeração, granulometria, umidade, pH e temperaturas todos esses parâmetros devem estar em equilíbrio para que a ação microbiana seja eficiente (MENDES et al., 2016).

Após a compostagem é obtido um produto de cor escura, cujo os parâmetros físico-químicos e biológicos devem atender alguns padrões estabelecidos pela legislação Resolução CONAMA nº481/2017: umidade, cinzas, fitotoxicidade, potencial de hidrogênio, condutividade elétrica, carbono orgânicos total, nitrogênio total, relação C/N, contagem de mesófilos e termófilos ou até detecção de algum patógeno (BRITO et al., 2008; VALENTE et al., 2016).

3.5.1. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus é uma bactéria Gram positiva do gênero *Bacillus*, pertencente à família *Bacillaceae*, em forma de bastonetes. Assim como a maioria das bactérias compreendidas por essa família. Pode ser classificada como aeróbia ou anaeróbia facultativa, esporogênica podendo apresentar seus esporos em elipsoidais ou cilíndricos. A bactéria *B. cereus*, é definida como bactéria patogênica causadora de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em humanos e animais, doenças de médio perigo sem risco de morte (síndromes eméticas e diarréicas) (LOGAN & DEVOS, 2009; GUINEBRETIERE et al., 2013).

A *Bacillus cereus* está sendo explorada para o tratamento de resíduos sólidos e efluentes por ser uma bactéria resistente às condições atípicas. Segundo Saleem et al., (2014), a *B.cereus* consegue reduzir a toxicidade dos compostos presentes no efluente de indústrias de papel, proporcionando um resíduo seguro para o descarte, também a utilização desta como probiótico no tratamento de resíduos sólidos industrial por fermentação.

3.5.2. *Enterococcus faecalis*

Bactéria láctica, homofermentativa de produto final ácido láctico (sem gás), anaeróbia facultativa, resistente a presença de NaCl, de morfologia cocos Gram positivos, podendo ser observados em pares ou em cadeias. Em geral, pode ser encontrada no meio ambiente (solo, água, plantas), flora intestinal e nos alimentos (SILVA et al., 2013).

O uso da *E. faecalis* como indicadora de contaminação de alimentos é incomum, em razão de ser resistente a fatores ambientais comparando-a as enterobactérias, mas é indicadora de processo de desinfecção em indústrias de alimentos na qualidade higiênico-sanitária. (CRAVEN et al., 1997). Segundo Rai et al., (2010), o gênero *Enterococcus* na aplicação no tratamento de resíduos de curtumes pode ser viável, pois no processo fermentativo pôde-se perceber propriedades antioxidantes e presença de aminoácidos para reutilizar esse resíduo na alimentação animal, fornecendo caminho para novos estudos referente a segurança de alimentos desse composto.

4. Capítulo I – Artigo I

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE GENE DE BACTÉRIAS HALOFÍLICAS/HALOTOLERANTES OBTIDOS DE ISOLADOS DE BACALHAU SECO SALGADO (GADUS SP.).

THAYLI RAMIRES ARAUJO¹, ROGER VASQUES MARQUES², CAROLINA DA SILVA GONÇALVES³, EDUARDA DUVAL HALLAL, TASSIANA RAMIRES¹, WLADIMIR PADILHA DA SILVA¹, LUCIARA BILHALVA CORRÊA³, ÉRICO KUNDE CORRÊA¹

¹Universidade Federal de Pelotas – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

²Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Saneamento Ambiental

³Universidade Federal de Pelotas – Centro de Engenharias

⁴Universidade Federal de Pelotas – Faculdade de Veterinária
thayliraraujo@gmail.com

RESUMO

O bacalhau é um pescado de grande importância de importação no Brasil de comercialização seca e salgada sendo um ambiente em potencial para a colonização de bactérias halotolerantes e halofílicas. O objetivo no presente estudo foram isolar e identificar bactérias resistentes a alta concentração salina a fim de avaliar sua capacidade de crescimento em diferentes temperaturas (35, 45 e 60 °C), em diferentes pH (4,5; 7,0 e 9,5), com uma concentração de NaCl fixada. Foram constatados 4 isolados que melhor se desenvolveram em condições de temperatura a 35°C de diferentes pH, considerados portanto microrganismos mesófilos e identificados através do DNA 16S – 252pb. Todavia, as cepas identificadas *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis* exibiram crescimento em alta pressão osmótica, porém a *B.cereus* apresentou maior resistência e progresso em unidade formadoras de colônias que a *E. faecalis*, no entanto, as cepas não são do domínio Archaea, mas podem ser consideradas bactérias halotolerantes por se desenvolverem em concentração salina de 7,5% NaCl.

Palavras-chaves: resistência salina, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, pressão osmótica

ABSTRACT

Cod is a fish great import importance in Brazil of dry and salty commercialization, being a potential environment for colonization of halotolerant and halophilic bacteria. The objective of the present study was to isolate and identify bacteria rresistant to high salt concentration in order to evaluate their growth capacity at different temperatures (35, 45 and 60 °C) at different pH (4,5; 7,0 and 9,5), with a fixed NaCl concentration. Four isolates were found that best developed under temperature conditions at 35 °C of different pH, considered as mesophilic microorganisms and identified through ADN 16S – 252bp. However, the strains identified *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecalis* showed growth in high osmotic pressure, but *B.cereus* presented greater resistance and progress in colony forming units than *E. faecalis*, however, the strains are not of the Archaea domain, but can be considered halotolerant bacteria because they grow in saline concentration of 7,5% NaCl.

Keywords: saline resistance, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, osmotic pressure

INTRODUÇÃO

O Gadus é um peixe de água fria e salgada de países da Islândia e Noruega, sendo importado e consumido em grande número nos países do sul da Europa e países latino-americanos como o Brasil (MARTINEZ-ALVAREZ & GÓMEZ-GUILLÉN, 2013). A comercialização desse pescado feito sob a forma seca e salgada, resultado do processo de salga tradicional para preservação das características sensoriais e conservação do alimento, acarretando no enrijecimento da carne, cessão de líquido das células e músculos. O peixe bacalhau pode ser encontrado como: Gadus Morhua, Macrocephalus, Saithe, Ling e Zarbo e a qualidade do peixe pode ser classificado em imperial, universal e popular (BRÁS & COSTA, 2010; FERREIRA, 2014).

Apesar da salga ser um método de conservação de alimentos onde o aumento da concentração salina (NaCl) tem efeito de desidratação na carne fresca, ainda assim pode ocorrer colonização de diversos microrganismos que são tolerantes a essa baixa atividade de água (Aw). As bactérias halotolerantes que podem se desenvolver na presença ou ausência de sal e as bactérias halofílicas que requerem a presença de sal para seu desenvolvimento (YEANNES et al., 2011).

As bactérias que crescem na presença de sal podem ser classificadas como halotolerantes que se desenvolvem em concentrações salinas de 1 a 5% aproximadamente, halofílicas moderadas entre 5 e 10% e halofílicas extremas entre 15 e 30% são de morfologia geralmente cocos ou bacilos e encontradas em ambientes altamente salinos, como ambientes marinhos, alimentos salgados (carne de sol) (SCHUBERT et al., 2009; SALLOTO et al., 2012; ARAUJO et al., 2017).

A utilização desses microrganismos têm se expandido já que estes tem uma grande importância nas dinâmicas industriais e nas aplicações biotecnológicas por sua atividade enzimática e resistência a esses ambientes adversos. Sua aplicação se estende desde biopolímeros e exopolissacarídeos em processos industriais de alimentos Essghaier et al. (2009); Carignatto et al. (2011), uso de enzimas nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos Vaz et al. (2015); Campos et al. (2011), polihidroxicarbonatos em plásticos biodegradáveis López et al. (2015); Bhagowati et al. (2015), área da medicina Díaz-Cárdenas et al. (2017) e em processos de tratamento de resíduos e efluentes como também no uso da biorremediação ambiental (DUAN et al., 2015; PUGAZHENDI et al., 2017). Embora as bactérias halofílicas do domínio Archaea sejam datadas de milhões de anos, são candidatos

notáveis em futuros investimentos de utilização e exploração de potencial, pois os microrganismos tradicionais não tem tal capacidade de adaptação em meios extremos.

Tendo vista, o possível desenvolvimento biotecnológico, o objetivo desse trabalho foi identificar microrganismos isolados de bacalhau seco salgado (*Gadus* sp.), discriminados como bactérias halofílicas moderadas e/ou halotolerantes em condições diversas de temperaturas e pH em pressão osmótica de 7,5% NaCl.

METODOLOGIA

A metodologia foi procedida em dois experimentos, sendo o primeiro o isolamento de bactérias de uma matriz alimentar e testes confirmativos, segundo identificação de gene 16S dos isolados selecionados.

Isolamento de bactérias e testes confirmativos

Foram coletados 100g de bacalhau seco salgado no comércio local da cidade de Pelotas, Rio grande do Sul (latitude: -31.776 e longitude: 52.3594) e transportada em caixa térmica para o laboratório de análise Núcleo de Ensino, Pesquisa e Extensão em Resíduos e Sustentabilidade (NEPERS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL).

O isolamento partiu de 25g de amostra homogeneizados em 225 mL de caldo lactosado com o pH ajustado em (4,5; 7 e 9,5) em sacos estéreis. Após foi realizada a diluição seriada em água peptonada a 0,1%, onde 1 mL do caldo lactosado foi transferido para a diluição 10^{-1} , a partir do tubo da diluição 10^{-1} foram produzidas as demais da mesma maneira até a diluição 10^{-12} e plaqueamento por aerobiose em ágar sangue por método de esgotamento de superfície e microaerobiose em Plate Count Ágar (PCA). As placas foram incubadas em temperaturas de (35, 45 e 60 °C) de incubação no tempo de 48 ± 2 horas, experimento executado em triplicata, usando o método APHA 08:2015 com modificações (RYSER & SCHUMAN, 2015).

Após o crescimento em estufa, uma colônia de cada placa após a incubação foi retirada e submetida a um novo crescimento em caldo Brain Heart Infusion (BHI) em duas temperaturas (35 e 45 ± 1 °C) por 24 horas e plaqueamento em triplicata em PCA pelo método de estriamento, e novamente incubada por 48h a 35 ± 1 °C e 45 ± 1 °C. Os isolados obtidos foram armazenados em geladeira em tubos contendo Trypticase Soy Ágar (TSA) inclinado (RYSER & SCHUMAN, 2015).

Posteriormente, uma alçada dos isolados armazenados foram submetidos a um crescimento *starter* em tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo BHI para um pré-enriquecimento, por 48h à temperatura de 35 ± 1 °C. Após foram transferidas alíquotas de 1 mL do pré-enriquecimento para 9 mL de caldo BHI inteirado com 7,5% de NaCl e incubados à 35 ± 1 °C/48h. Após a multiplicação microbiana se conduziu as diluições seriadas em água peptonada 0,1% (0 à -12) e realizado o plaqueamento por esgotamento de superfície em PCA, incubação invertida à 35 ± 1 °C/48h e efetuado a contagem padrão em placas (ISO 6887-1, 1999). Mais tarde, foram sujeitas aos testes de confirmação.

O teste morfológico foi conduzido seguindo o método de Hucker, os testes bioquímicos e fenotípicos (catalase, indol, citrato, oxidase, urease, vermelho de metila, Voges-Proskauer) (SPERBER et al., 2015).

Identificação de gene

Os isolados selecionados foram submetidos a extração de DNA genômico, segundo o protocolo descrito por Sambrook & Russel (2001), com adaptações. Foi realizada a reação em cadeia polimerase (PCR) para a detecção do gene *16S – amplicon* 252 pares de base (pb). Os primers (F- GGACGGGTGAGTAACACGTGG e R- TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT) e as condições foram previamente descritos por BARON et al. (2004). As condições utilizadas foram: desnaturação inicial 95 °C por 4min, 32 ciclos de 95 °C por 2min, 52,7 °C por 2 min, 72 °C por 2min, seguido por uma extensão final a 72 °C por 2 min. O produto amplificado foi separado através de eletroforese em gel de agarose 1,5%. A visualização e a análise dos amplicons foram realizadas usando transiluminador.

Foi realizado o sequenciamento a partir dos produtos purificados da PCR na utilizando o equipamento ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), interpretado por eletroferograma pelo programa Sequencing Analysis, utilizando uma plataforma online Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) na análise dos dados (PICOLLOTO, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 39 isolados oriundos de bacalhau seco salgado em diferentes valores de pH (4,5; 7,0 e 9,5), diferentes temperaturas (35, 45 e 60) e atmosfera (aerobiose e microaerobiose). Após, os isolados adquiridos foram submetidos ao

cultivo *in vitro* sob a concentração de 7,5% de NaCl e incubação na mesma temperatura do cultivo inicial. Do total de 39 isolados, quatro foram mais eficientes em se desenvolverem nas condições avaliadas e foram selecionados para a continuidade dos experimentos (Tabela 1).

Tabela 1: Condições de cultivo dos quatro isolados halofílicos com melhor potencial de multiplicação nos tratamentos realizados

Isolados	Temperatura	pH	Atmosfera	log.UFC.g ⁻¹
1	35 °C	4,5	Microaerobiose	15,39
2	35 °C	9,5	Aerobiose	13,18
3	35 °C	7,0	Microaerobiose	10,01
4	35 °C	7,0	Aerobiose	9,23

Os resultados da multiplicação bacteriana tiveram intervalo de tempo de 48 horas variando de 3,71 log.UFC.g⁻¹ à 15,39 log.UFC.g⁻¹, os 4 isolados apresentaram resultados acima da média 7,5959 log.UFC.g⁻¹ do total de 39 isolados.

Os isolados 2 e 4 mostraram β -hemólise e α -hemólise, ocorrendo a lise total e lise parcial da hemoglobina. A morfologia desses isolados foi confirmada através da coloração de Gram, sendo caracterizados como bacilos Gram-positivos. Apenas um dos isolados, diferiu-se do demais nos testes de oxidase mostrando teste negativo e urease positiva. Nos demais testes bioquímicos todos os isolados se comportaram igualmente; catalase, VM, indol positivos e VP, citrato negativos (Tabela 2).

Tabela 2: Resultado do diagnóstico dos testes bioquímicos dos isolados investigados.

Isolados	oxidase	catalase	VM	VP	citrato	urease	indol	GRAM	hemólise
1	+	+	+	-	-	-	+	+	
2	+	+	+	-	-	-	+	+	β
3	+	+	+	-	-	-	+	+	
4	-	+	+	-	-	+	+	+	α

Em um outro estudo realizado com isolamento de microrganismos a partir de bacalhau seco salgado isolaram microrganismos gram positivos de mesma morfologia e coloração obtido neste estudo, e desenvolveram o crescimento microbiano em distintas concentrações salinas, sendo uma das concentrações

observadas a estabelecida por este estudo e foi constatado que os microrganismos toleravam a concentração salina de 7,5% de NaCl, havendo o período de adaptação ao meio de cultura maior que o crescimento exponencial no tempo de 6h, mas ainda assim os microrganismos conseguiram se desenvolver nessas concentrações (ARAUJO et al., 2017). Gutiérrez-Arnillas e colaboradores, (2016), isolaram bactérias halofílicas produtoras de lipases de ambientes hipersalinos na Turquia e na Espanha capazes de se desenvolverem em até 20% de NaCl, em condições de 21,6 °C em pH 6,9 (PIÑAR et al., 2014).

O isolado 2 foi submetido ao teste de hemólise, através deste teste foi constatado que esse isolado é β -hemolítico, segundo a BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008), o β -hemolítico é caracterizado pela lise total das hemácias, sendo observado halos transparentes ao redor das colônias, esses microrganismos podem causar uma série de infecções desde as mais simples as mais graves (ZARDETO et al., 2014). O outro isolado submetido ao teste de hemólise, isolado 4, foi caracterizado como α -hemolítico, segundo BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008), o microrganismo α -hemolítico ocasiona a lise parcial da hemoglobina pelas hemácias e pode ser observado halos de coloração cinza envolto à colônia, encontradas também por atividade hemolítica parcial, ocorrendo a lise parcial das hemácias, no trabalho efetuado por Esparis et al., (2006).

Os 4 isolados amplificaram um produto de 252 pb, referente ao gene 16S. A identificação genotípica por PCR confirmou os genes dos quatro isolados estudados, os investigados 1 e 2 como *Bacillus cereus* com 99% de similaridade, o 3 resultou em 87% de similaridade com o gênero *Lactobacillus spp.*, e o isolado 4 no sequenciamento do gene obteve 85% de similaridade com a espécie *Enterococcus faecalis* (Figura 1).

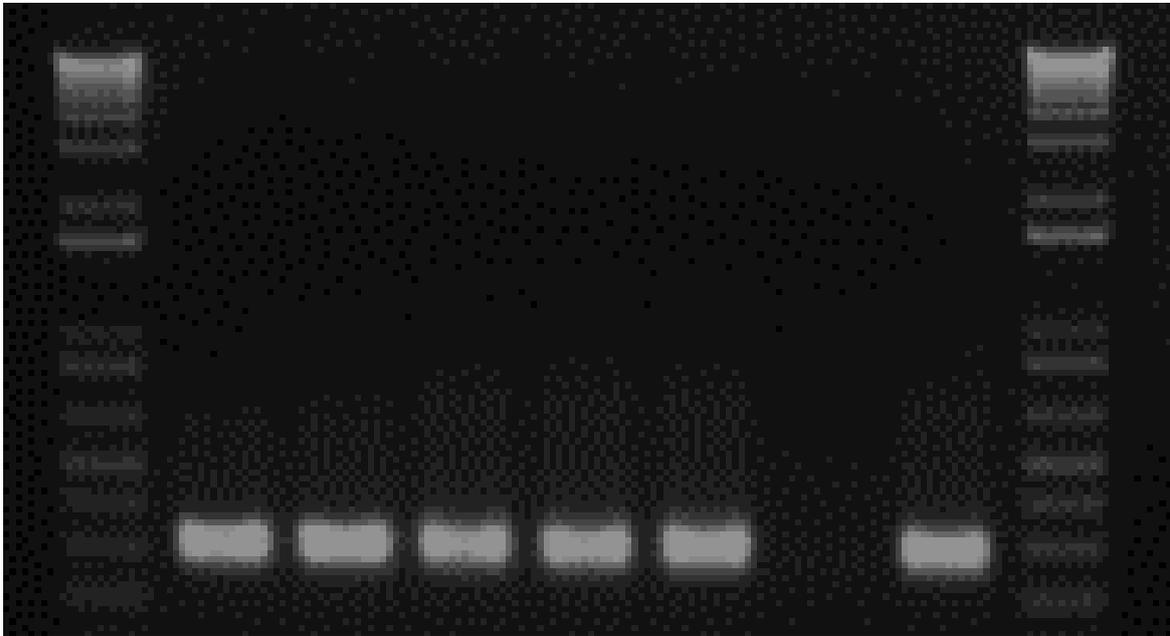


Figura 1: Amplicom de 252pb – gene 16S. 1.Marcador de 1 kb; 2. Isolado 1; 3. Isolado 2; 4. Isolado 3; 5. Isolado 4; 6. Isolado 4.1; 7. Controle negativo da reação (água); 8. Controle positivo (S. aureus ATCC 25923); 9. Marcador de 1 kb.

A *Bacillus cereus*, segundo a literatura, possui atividade enterotóxica por hemolisina BL(HBL), complexo que causa infecções diarreicas, chamadas de Síndrome Diarréica e Síndrome Emética (Jay, 2005). Kim e colaboradores (2017), constataram que havia o desenvolvimento de *B. cereus* em camarão salgado Jeotgal, previamente fermentado por alta concentração salina, avaliaram assim, em 10 °C ao longo de duas semanas e concentração de sal (5-15%) se poderiam inibir a multiplicação celular de *B. cereus* em camarão salgado Jeotgal previamente fermentado.

A *E. faecalis* indicadora de higiênico-sanitária de um estabelecimento, justamente por ser mais resistente a esses fatores ambientais atípicos. Segundo Sebastião e colaboradores (2015), no Brasil são identificados 4 espécies de *Enterococcus* como contaminante de pescados, dentro elas a mais comum a bactéria *Enterococcus faecalis*, e em seres humanos pode causar infecção urinária, meningite, além de ser transmitido através do toque, por isso a necessidade de higienização eficiente.

A bactéria *Lactobacillus spp*, é uma das mais utilizadas na fermentação de alimentos, podendo ser classificada como homofermentativa obrigatória, heterofermentativa facultativa e heterofermentativa obrigatória, ela é muito utilizada na preparação do iogurte, considerada bactéria fermentadora de lactose ou também chamada de bactéria ácido-lática (BAL), tem a capacidade de se desenvolver em pH baixos, tornando sua multiplicação celular lenta em pH neutro ou alcalino. O

Lactobacillus spp., tem um grande potencial probiótico e hoje está sendo muito explorado e isolado de vários alimentos para testes de sua viabilidade. O *Lactobacillus* exige a presença de diversos aminoácidos para seu desenvolvimento, e seu potencial de multiplicação em conteúdo de pescado é incontestável (HAAKENSEN, et al., 2009).

CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível isolar bactérias halotolerantes capazes de se multiplicarem na ausência ou presença de alta concentração de NaCl, o sequenciamento de DNA identificou *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus*. Esses isolados podem ser utilizados em desenvolvimento de trabalhos como que envolvam o tratamento de resíduos salinos, assim como desenvolvimento biotecnológico, por exemplo, a exploração da formação de biofilme que a cepa *B. cereus* é capaz de produzir. E a investigação através de meio de cultura diferenciais e *primers* específicos da espécie do gênero de *Lactobacillus* encontrado.

REFERÊNCIAS

- Araujo, T. R.; Schoeler, G. P.; Marques, R. V.; Voloski, F. L. S.; Durval, E. H.; Neves, W. T.; Corrêa, L. B.; Corrêa, E. K. Potential use of cod isolated bactéria (*Gadus sp.*) for treatment of saline residues and effluents. **International Journal of Development Research**. v.7, n.9, p.15189-15193, 2017.
- Baron, F.; Cochet, M. F.; Pellerin, J. L.; BEN ZAKOUR, N. O. U. R. I.; Lebon, A.; Navarro, A.; Proudly, I.; Le Louir, Y.; Gautier, M. (2004). Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**. v.67, n.10, p.2302-2305, 2004.
- Bhagowati, P.; Pradhan, S.; Dash, H. R.; Das, S. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus spp.* **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v.79, n.9, p.1454-1463, 2015.
- Brás, A.; Costa, R. Influence of brine salting prior to pickle salting in the manufacturing of various salted-dried fish species. **Journal of Food Engineering**. v.100, n.3, p.490-495, 2010.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Módulo 4 Gram-positivos, *Streptococcus* spp, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_stre.htm . Acesso em: 28 abr. 2018.

Campos, M.; Gonçalves, P. M. B.; de Camargo Júnior, F. B.; de Andrade, J. P.; Gaspar, L. R. **Photochemistry and Photobiology**. v.88, n.3, p.748-752, 2011.

Carignatto, C. R. R.; Oliveira, K. S. M.; De Lima, V. M. G; Neto, P. O. New culture médium to xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Indian Journal of Microbiology**. v.51, n.3, p.283-288, 2011.

Díaz-Cárdenas, C.; Cantillo, A.; Rojas, L. Y.; Sandoval, T.; Fiorentino, S.; Robles, J.; Ramos, F. A.; Zambrano, M. M.; Baena S. Microbial diversity of saline environments: Searching for cytotoxic activities. **AMB Express**. v.7, n.1, p.223, 2017.

Duan, J.; Frang, H.; Su, B.; Chen, J.; Lin, J. Characterization of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic denitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. **Bioresour Technol**. v.179, p.421-428, 2015.

Esparis, C. M.; Teixeira, L. M.; Irino, K.; Gil, P. F.; Almeida, M. T. B.; Lopes, G. S.; Bravo, V. L. R.; Pacheco, R. S. Regua-Mangia, A. H. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39, n.6, p.573-576, 2006.

Essghaier, B.; Fardiau, M. L.; Cayol, J. L.; Hajlaoui, M. R.; Boudabous, A.; Jijakli, H.; Sad fi-zouaoui, N. Biological control of grey mould in strawberry fruit by halophilic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. v.16, n.3, p.833-846, 2009.

Ferreira, Sara Isabel Fernandes. **Estudo microbiológico da demolha do bacalhau salgado verde**. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado integrado em Engenharia Biológica – Tecnologia Química e Alimentar) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2014.

Gutiérrez-Arnillas, E.; Rodríguez, A.; Sanromán, M. A.; Deive, F. J. New sources of halophilic lipases: isolation of bacteria from Spanish and Turkish saltworks. **Biochemical Engineering Journal**. v.109, p.170-177, 2016.

Haakensen, M.; Dobson, C. M.; Hill, J. E.; Ziola, B. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster & White 1964) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. Nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, p.615-621, 2009.

ISO 6887-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions**, 1st ed. The International Organization for Standardization, 1999.

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

Kim, M.; Park, S. Y.; Park, T. J.; Ha, S. Effect of sodium chloride on the reduction of *Bacillus cereus* in shrimp *Jeotgal* during refrigerated storage. **Journal Food Safety**. v.37, n.1, 2017.

Kim, M.; Park, S. Y.; Park, T. J.; Ha, S. Effect of sodium chloride on the reduction of *Bacillus cereus* in shrimp *Jeotgal* during refrigerated storage. **Journal Food Safety**. v.37, n.1, 2017.

López, N. I.; Pettinari, M. J.; Nikel, P. I.; Méndez, B. S. Polyhydroxyalkanoates much more than biodegradable plastics. **Advances in Applied Microbiology**. Academ Press. v.93, p.73-106, 2015.

Martinez-Alvarez, O.; Gómez-Guillén, C. Influence of mono – and divalent salts on water loss and properties of dry salted cod fillets. **LWT – Food Science and Technology**. v.53, n.2, p.387–394, 2013.

PICOLOTTO, Patrícia Regina Dhein. **Expressão de genes codificadores de versões truncadas da uréase de *Canavalia ensiformis* em plantas**. 2014. 45 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia Bacharelado) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Piñar, G.; Krakova, L.; Pangallo, D.; Piombino-Mascalì, D.; Maixner, F.; Zink, A.; Sterflinger, K. Halophilic bacteria are colonizing the exhibition areas of the Capuchin Catacombs in Palermo, Italy. **Extremophiles**. v.18, n.4, p.677-691, 2014.

Pugazhendi, A.; Qari, H; Basahi, J. M. A. B.; Godon, J. J.; Dhavamani, J. Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and treatment of petroleum wastewater at extreme conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v.121, p.44-54, 2017.

Ryser, E. T.; Schuman, J. D. Mesophilic aerobic plate count. In: Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. (eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2015. Chapter 8, p.95-101.

Salloto, G. R. B.; Pinto, L. H.; Lima, J. L.; Vieira, R. P.; Cardoso, A. M.; Martins, O. B.; Clementino, M. M. A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico. **Revista Brasileira de Biociência**. v.10, n.2, p.226-234, 2012.

Sambrook, J.; Russell, D. **Molecular cloning**: A Laboratory Manual. Third Edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press v.1, Chapter 6, Protocol 7, 2001.

Schubert, B. A.; Lowenstein, T. K.; Timofeeff, M. N.; Parker, M. A. How do prokaryotes survive in fluid inclusions in halite for 30 ky? **Geology**. v.37, n12, p.1059-162, 2009.

Sebastião, F. D. A.; Furlan, L.; Hashimoto, D. T.; Pilarski, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, p. 409–424, 2015.

Sperber, W. A.; Moorman, M. A.; Freier, T. A.; Cultural methods for the enrichment and isolation of microorganisms. In: SALFIRNGER, Y. & TORTORELLO, M. L. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. **American Public Health Association (APHA)**. Chapter 5, 2015, p.67-73.

Vaz, G. C.; Bahia, A. P. C. O.; De Figueiredo Muller Ribeiro, F. C.; Xavier, C. H.; Patel, K. P.; Santos, R. A. S.; Fontes, M. A. P. Cardiovascular and behavioral effects produced by administration of liposome-entrapped GABA into the rat central nervous system. **Neuroscience**. v.285, p.60-69, 2015.

Yeannes, M. I.; Ameztoy, I. M.; Ramirez, E. E.; Felix, M. M. Culture alternative medium for the growth of extreme halophilic bacteria in fish products. **Food Science and Technology**. v.31, n.3, p.561-566, 2011.

Zardeto, G.; Guillen, F. O.; Camacho, D. F. Pesquisa de Streptococcus agalactiae em gestantes como rotina laboratorial de exames pré-natais. **Revista Uningá**. v.42, p.77-84, 2014.

5. Capítulo II – Short Communications

MICROCOMPOSTAGEM DE LODO SALINO DO TRATAMENTO DE EFLUENTES DE INDÚSTRIA PESQUEIRA COM SERRAGEM E CASCA-DE-ARROZ ADICIONADOS DE INÓCULO BACTERIANO.

INTRODUÇÃO

O meio ambiente nos últimos anos não está sendo capaz de reciclar a exorbitante de resíduos gerados, conseqüente das atividades antropogênicas desde indústrias, agrícola e pecuária. Com o aumento populacional e a preocupação em atender as necessidades básicas dos seres humanos, a geração de resíduos tem se tornado uma problemática para a sociedade contemporânea e comprometendo a qualidade dos recursos naturais, qualidade de vida da população, devido a poluição ambiental e efeitos deletérios nos recursos hídricos, solo e ar (MORERO et al., 2015; PIZARRO et al., 2016). Também o uso de recursos naturais (energia, água, matéria-prima) nas atividades agroindustriais para transformação de um material bruto em um produto processado de maior consumo (SCHMIDHUBER & TUBIELLO, 2007; RAJ & ANTIL, 2011).

Os resíduos orgânicos gerados pelas atividades agroindustriais são de grande importância, uma vez reciclados, pois podem substituir os fertilizantes sintético, diminuindo ainda a dependência com importação de fertilizantes e acarretando no aumento do reciclo da matéria orgânica favorecendo a garantia da segurança alimentar (SABIHA et al., 2016).

Na indústria de alimentos o cloreto de sódio (NaCl) é utilizado em diversas atividades, em produtos de cárneos, conservas, produtos lácteos, pescado. Nesta, o sal está presente desde a descarga do material, passando pela etapa de processamento e chegando no efluente (LU et al., 2007; SERRANO et al., 2013). O tratamento do efluente gera uma massa semissólida chamada de lodo, oriunda da sedimentação de sólidos ao final do processo. Esse material é rico em matéria orgânica e portanto, possui um potencial poluidor importante pela carga orgânica e de macro nutrientes (N, P, K) que possui. Esse resíduo é fator determinante da qualidade de água, principalmente as superficiais, intensificadas quando o corpo receptor possui um perfil lêntico (DIAZ et al., 2002; LEFEBRE & MOLETTA, 2006; TAN et al., 2015; WU et al., 2015; MARTÍN et al., 2015).

Um dos métodos de estabilização de resíduos sólidos é a compostagem, que consiste na degradação da matéria orgânica por ação de microrganismos. Todavia, a microbiota natural é incapaz de degradar esses resíduos salinos por serem sensíveis a presença de sais. O uso de bactérias halofílicas ou halotolerantes podem ser uma alternativa para beneficiar o tratamento, pois possuem resistência a tais condições ambientais, que permite manter atividade celular consequentemente a degradação de matéria orgânica (CORRÊA et al., 2008). A compostagem geralmente é realizada em leiras e sua estrutura depende do resíduo a ser tratado e do método de construção, podendo ter medidas de aproximadamente 1,5 a 1,8m de altura e largura de 4 a 4,5m. Pode ser realizada em composteiras domésticas de 250 litros, 61 litros, 15 litros, entre outros. Enquanto a microcompostagem está relacionada a escala laboratorial em volumes bem menores (1 litro, 2 litros) (VICENTINI et al., 2009; BOUGOUFFA et al., 2014).

Além do aporte nutricional necessário para o desenvolvimento da microbiota no resíduo, a compostagem ocorrerá com eficiência quando presente materiais estruturantes como (casca-de-arroz e serragem), chamados de substratos que proporcionam espaços intersticiais e promovam troca gasosa com o meio, fornecendo carbono para que haja desenvolvimento dos microrganismos decompositores e permitindo a aeração. O equilíbrio entre carbono promovido pelo substrato e nitrogênio presente no lodo da estação de efluentes, é fato determinante para a correta condição do processo de compostagem.

Analisado a problemática descrita, o objetivo deste trabalho foi avaliar a microcompostagem de lodo da estação de tratamento de efluentes da indústria pesqueira marítima com a presença de casca-de-arroz e serragem como materiais estruturantes e adição de bactérias halotolerantes com o objetivo de investigar as melhores condições operacionais que promovem a compostagem assistida por inóculo halotolerante, como alternativa economicamente viável para o tratamento de resíduos agroindustriais salinos.

METODOLOGIA

O experimento foi conduzido por delineamento completamente casualizado com quatro repetições, em arranjo bifatorial sendo o primeiro fato o “tempo de incubação” (0; 3; 13; 16; 26 dias) e o segundo “aplicação de cepas” (EF; BC; PL; CN; CP).

A microcompostagem foi realizada em biorreatores de 1 litro interados com 200 mL de casca-de-arroz, 200 mL de serragem e 400 mL de lodo de pescado distribuídos em 5 tratamentos em quadruplicata (Tabela 1). Os microrganismos utilizados neste experimento foram isolados e identificados em experimento prévio (conforme CAP-I).

Tabela 1: Tratamentos avaliados no experimento.

Variáveis independentes		Variáveis dependentes
Microrganismo	Tempo (dias)	
<i>B.cereus</i> (BC)		pH
<i>E.faecalis</i> (EF)		Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$)
Consórcio bacteriano (PL)		Carbono orgânico total (%)
Controle negativo (CN)		Nitrogênio total (%)
Controle positivo (CP)		Umidade (%)
		Matéria mineral (%)
		Temperatura

Os biorreatores foram interados com os volumes propostos para cada resíduo e adicionado os microrganismos diretamente aos biorreatores homogeneizados. Antes de sua adição, as bactérias foram submetidas ao enriquecimento em Caldo Infusion Brain-Hearth (BHI) com a presença de 7,5% de NaCl, descrito por Mauriello et al., (2004) com modificações, para a obtenção da concentração inicial desejada ($C = \log 8 \text{ UFC.mL}^{-1}$).

Os biorreatores foram sujeitos as fases da compostagem por processo controlado de temperatura em estufa no período de 26 dias (Tabela 2), e a cada término de fase realizada coletas de amostras.

Tabela 2: Protocolo de incubação dos biorreatores na microcompostagem controlada.

Dias	Temperaturas (°C)	Fases
1	25	
1	35	Mesófila
1	45	
10	55	Termófila
1	45	
1	35	Humificação
1	25	
10	25	Estabilização

Foram coletadas cinco amostras durante o experimento, no tempo 0 (antes da incubação), 3º, 13º, 16º e 26º dia de incubação e sujeitas as análises físico-químicas para avaliação do composto no tempo estudado.

As análises físico-químicas envolveram a determinação da matéria orgânica pelo método de Walkley-Black Tedesco (1995), nitrogênio total pelo método de Kjeldahl segundo Marques (2013), pH e condutividade elétrica por Tedesco (1995), teor de matéria seca e mineral das amostras por métodos gravimétricos (AOAC, 1997).

Análise estatística

Os dados obtidos foram tabulados e tiveram a sua normalidade testada usando o teste de Shapiro-Wilk sua homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. Após a verificação destes pressupostos, foi conduzido a análise de variância ($\alpha = 0,05$) e observando significância estatística ($p < 0,05$) para a interação dos fatores foi aplicada regressão linear, seguindo ajuste a modelo polinomial conforme Equação 1. Na ausência de significância na interação entre os fatores pelo teste F ($p > 0,05$), o fator quantitativo (tempo de incubação) foi avaliado por análise de regressão, enquanto que o fator qualitativo (aplicação de cepa) foi avaliado pelo teste de Duncan ($\alpha = 0,05$).

$$y = y_0 + ax + bx^2 \quad (1)$$

Onde, “y” é a respectiva variável resposta, “y₀”, “a” e “b” são as constantes do modelo e “x” tempo de incubação (d).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado de carbono orgânico total (%) referente ao tempo pode ser observados na Figura 1.

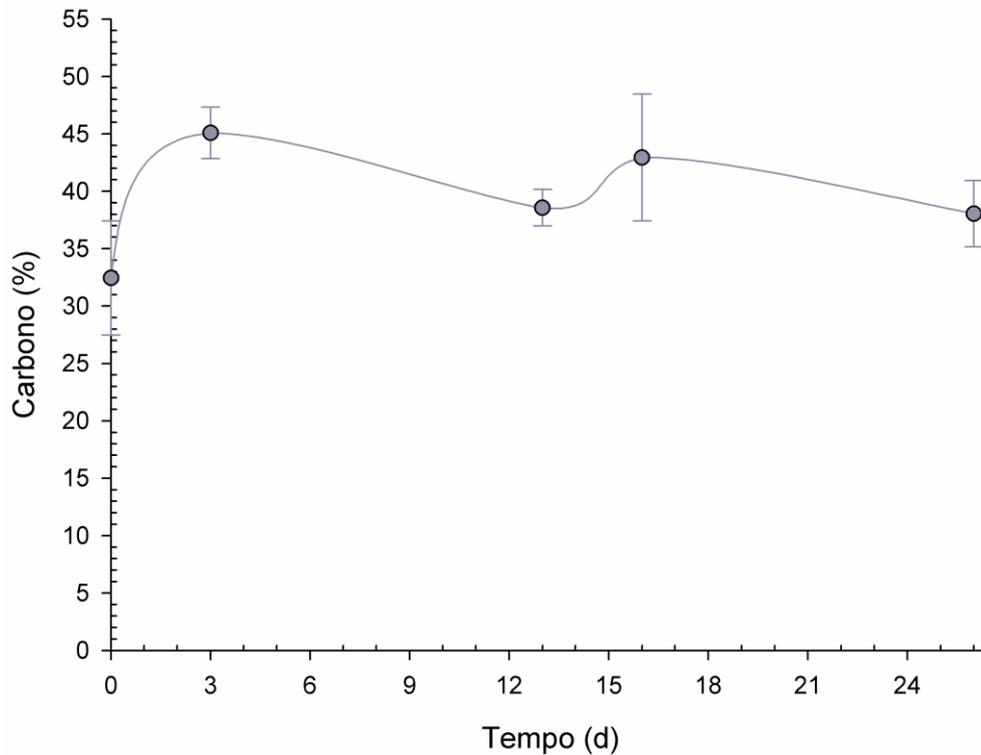


Figura 1: Carbono total orgânico (%) do lodo de estação de tratamento de efluente em processo de compostagem.

Ao longo do tempo, o teor de carbono aumenta significativamente até o 13º dia, apresentando 48% no seu intervalo máximo e 38% no intervalo mínimo. No 26º dia (última coleta) os valores de máximo e mínimo diminuem (máx 41%; mín 35%) comparando com a coleta anterior, afirmando a tendência de declínio na concentração de carbono. Na Tabela 3 estão apresentados os valores de carbono referentes as cepas pelo teste de Duncan.

Tabela 3: Teor de carbono referente ao uso de microrganismos halotolerantes.

Microrganismo	Carbono (%)
EF	35,52 ^b
PL	38,18 ^{ab}
CP	38,95 ^{ab}
BC	40,47 ^{ab}
CN	43,16 ^a

BC = *Bacillus cereus*, EF = *Enterococcus faecalis*, PL = consórcio bacteriano, CP = Controle positivo, CN = Controle negativo.

O controle negativo por não apresentar cepas e NaCl obteve o maior valor de carbono em porcentagem. Contudo estatisticamente os tratamentos CN, BC, CP e

PL não se diferem ($p>0.05$), assim como os tratamentos BC, CP, PL e EF. Porém o controle negativo é diferente do tratamento por *E. faecalis*. O que significa que atuação cepa *E. faecalis* pode levado a queda do teor de carbono.

O tempo e a ação de cepas referente ao carbono foram avaliados separadamente por terem significância. A interação de ambos não apresentaram significância.

Outros estudos relacionados a compostagem, mostraram valores semelhantes referente ao carbono orgânico total, sendo justificados pela elevada ação bacteriana (GUIDONI et al., 2012; CORRÊA et al., 2012; GUIDONI et al., 2018). Todavia, a literatura constata que durante o período de compostagem o teor de carbono orgânico total tende ao declínio (KIEHL, 2004).

Os resultados de nitrogênio total (%) podem ser observados de acordo com a Figura 2.

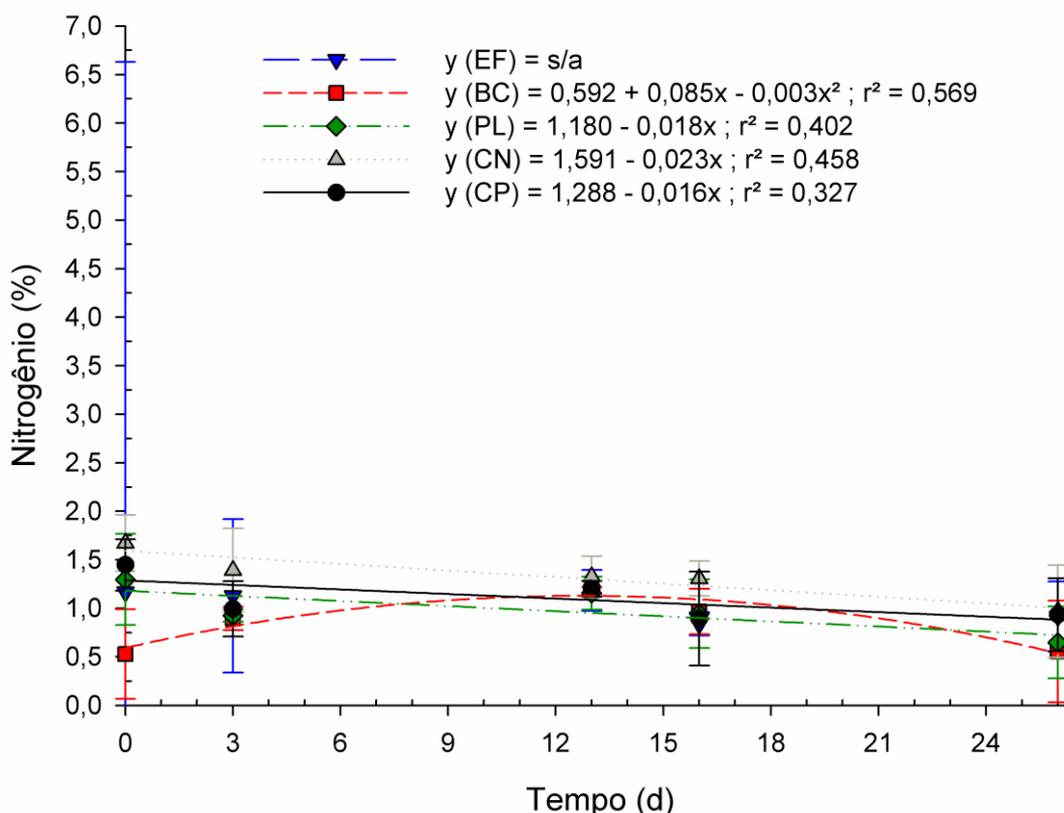


Figura 2: Resultados de nitrogênio total (%) referente ao tempo e a cepa utilizada na incubação. *s/a: sem ajuste

Os valores de nitrogênio total (%), variaram de acordo com tempo do processo de compostagem. Havendo diferença entre os tratamentos propostos neste estudo e interação entre os fatores tempo e cepa utilizada. Os maiores valores

obtidos ao final dos 26 dias de incubação foram apresentados pelos tratamentos CN e CP (0,993% e 0,872%), os demais tratamentos apresentaram valores inferiores. Esses valores podem ser explicados pela presença dos inóculos adicionados, bactérias halotolerantes ou consideradas halofílicas na presença de um ambiente salino atuaram como bactérias denitrificantes, justificando os valores baixos apresentados (LEFEBRE & MOLETTA, 2006).

O pH observado na microcompostagem durante o período do experimento está apresentado na Figura 3.

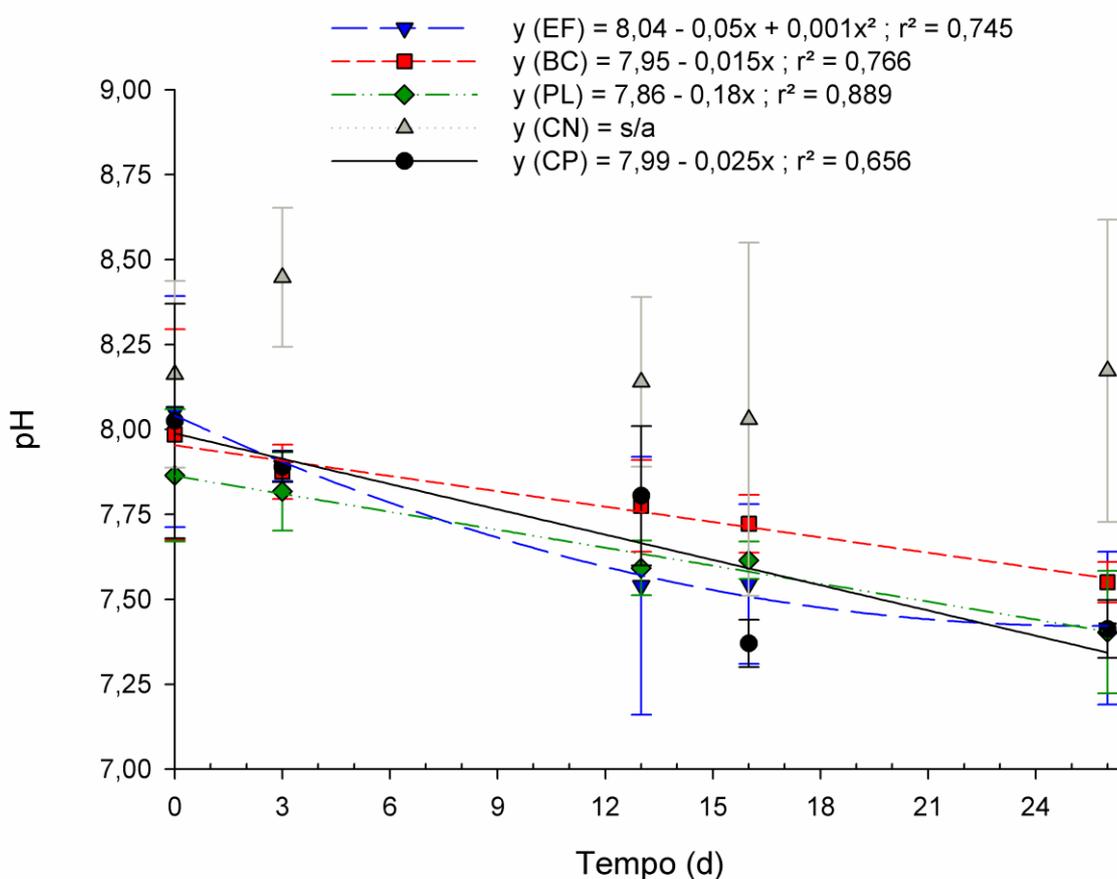


Figura 3: Evolução de pH durante o período experimental. *s/a: sem ajuste.

O pH durante o período de compostagem manteve a tendência de declínio. Dos tratamentos estudados, o que apresentou propensão para a estabilidade a partir do 22º dia do experimento foi o tratamento EF. O tratamento BC ao final do experimento apresentou o maior valor de pH, 7,56. O pH obteve diferença significativa entre os dias e em relação as cepas utilizadas, havendo interação entre os fatores. Os pH's ao final do período experimental se apresentaram como neutros variando de 7,25 a 7,6 aproximadamente. Todavia, a Legislação Brasileira

estabelece pH no mínimo 6 para a comercialização de algum composto (BRASIL, 2009). O pH geralmente ao final do experimento tendeu a basicidade pela oxidação de ácidos orgânicos por ação microbiana. Assim como mostrado no nitrogênio, as bactérias halofílicas são denitrificantes, logo não ocorreu a transformação do nitrogênio amoniacal em nitrato havendo uma alta atividade microbiana, permanecendo a linha de tendência em queda, porém no tratamento CP não há adição de bactérias halotolerantes, e está justificado pela presença de sal meio e excesso de carbono que podem propiciar condições ácidas durante a compostagem ou quedas de pH. (LEFEBRE & MOLETTA, 2006; VALENTE et al., 2009; GUIDONI et al., 2012; Li et al., 2013).

A condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$) dos tratamentos estudados estão ilustrados na Figura 4.

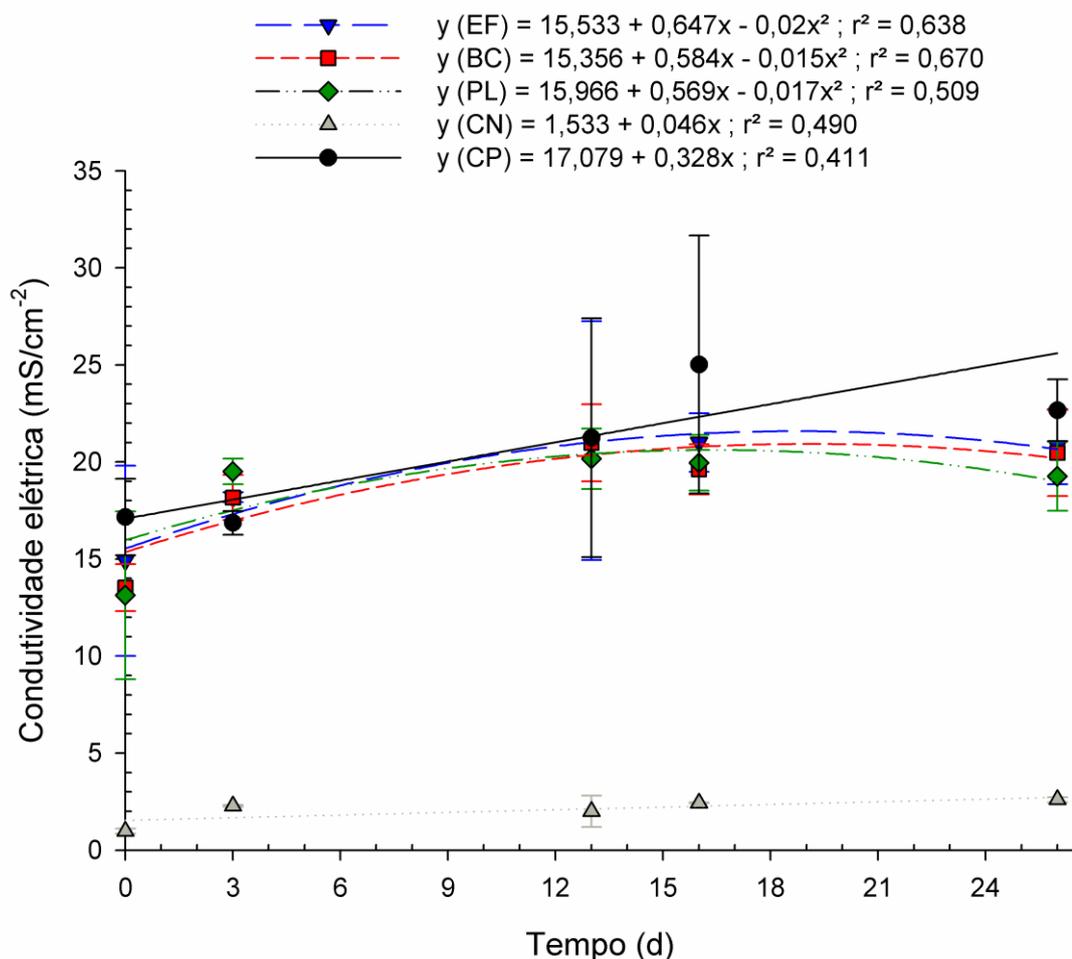


Figura 4: Condutividade elétrica dos tratamentos avaliados.

De acordo com a figura, pode-se observar um aumento na condutividade elétrica durante os primeiros 16 dias de incubação para os tratamentos (BC, PL, EF), após esse período a linha obteve uma tendência de declínio até o final do período estimado para este estudo. Enquanto nos tratamentos CP e CN é visível a diferença, sendo um o maior valor obtido ao final do experimento e o outro o menor valor obtido, respectivamente. Esse comportamento de aumento de condutividade elétrica é esperado pela degradação da matéria orgânica presente nos resíduos, havendo essa degradação ocasiona a mineralização (BERNAL, 2009). Porém nos tratamentos com a adição de inóculo a condutividade elétrica depois de um período iniciou a queda da curva, tendo o menor valor apresentado pelo tratamento PL, ação das duas bactérias adicionadas ao meio. Segundo Rasapoor e colaboradores (2016), pode ter ocorrido essa queda na condutividade elétrica pela evaporação parcial de amônia seguido de outros grupos básicos para o processo de compostagem, assim como a formação de ácidos orgânicos que são menos solúveis.

A Figura 5, mostra os resultados de umidade (%) obtidos nos tratamentos durante o período de compostagem estudado.

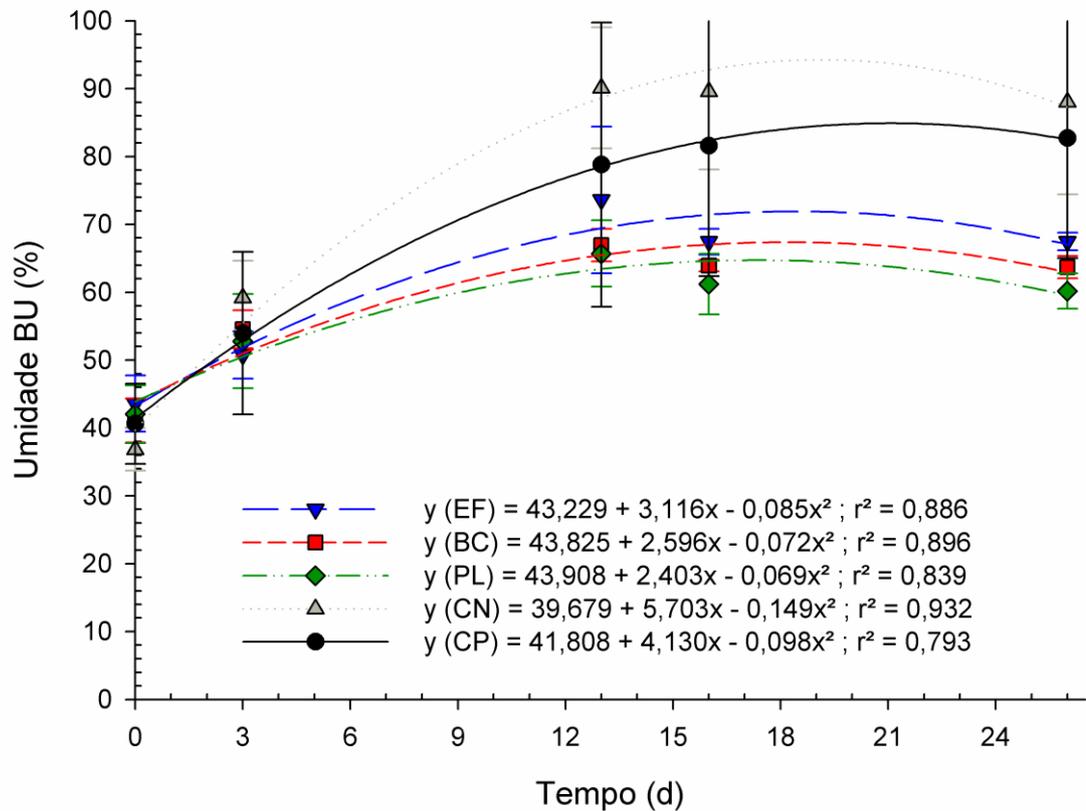


Figura 5: Umidade (%) dos tratamentos referente ao tempo e cepas utilizadas.

No tempo zero do experimento os tratamentos partiram de valores de umidade aproximadamente de 45%, ao transcorrer o tempo a umidade dos tratamentos foi se elevando e aos 17 dias de incubação para os tratamentos EF, BC e PL foi iniciada uma queda na curva. Enquanto para o tratamento CP foi possível observar no 21º dia e para CN no 20º dia. No final dos 26 dias os tratamentos obtiveram os valores acima de 50% de umidade, (EF 66,78%; BC 62,10%; PL 59,74%; CN 87,23%; CP 82,94%). No tratamento CP, o valor alto apresentado pode ser justificado pela presença de sal no meio ocorrendo a disputa entre o equilíbrio osmótico no meio com a microbiota natural, assim inibindo a atividade dos microrganismos e o tratamento CN apresentou umidade acima do valor permitido e exigido pelo MAPA para compostos (BRASIL, 2009). A umidade é um dos parâmetros essenciais para serem avaliados na compostagem. Segundo Yañes et al., (2009) os valores considerados aceitáveis de umidade é de mínimo de 40% e máximo de 60% no composto. Porém, Sellani et al., (2008) realizaram estudos e comprovaram que a atividade microbiana foi maior em seu experimento quando a

umidade estava entre 50% a 70%, assim como encontrados alguns valores neste estudo. Enquanto Sivakumar et al., (2007) verificou em seu experimento que a maior atividade microbiana foi constatada com valores de umidade de 40 a 65%.

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos de matéria mineral (%) presente nos tratamentos.

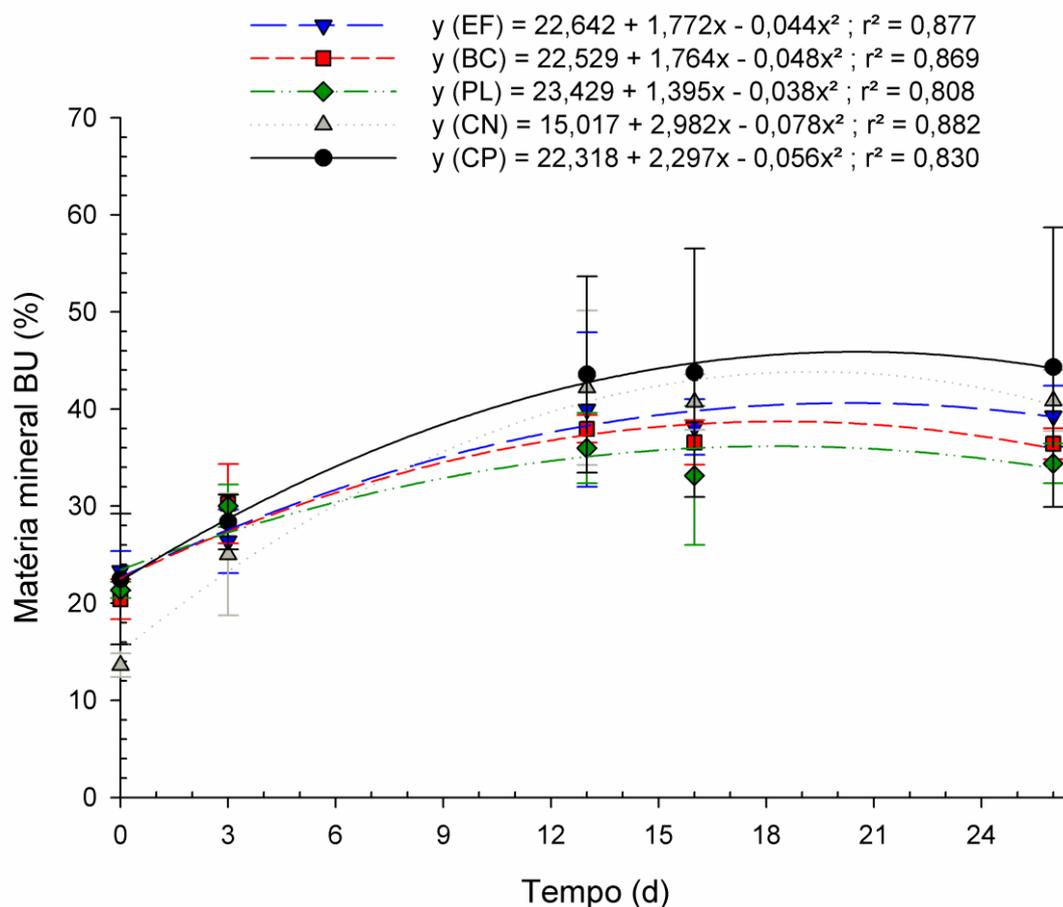


Figura 6: Matéria mineral (%) apresentada nos tratamentos avaliados no estudo.

De acordo com a Figura 6 é possível obter valores para os tratamentos durante todo o período estudado da microcompostagem, CP apresentou o maior valor para cinzas durante todo o intervalo estudado e ao final foi constatado valor de 44% de matéria mineral, enquanto PL o menor ao final 34%. O tratamento CP apresentou esse aumento do conteúdo de matéria mineral referente ao ponto inicial, devido a redução da matéria orgânica e mineralização do composto. Em outro estudo sobre compostagem, os resultados obtidos ao final do processo também foram maiores comparando com os valores obtidos no início do processo de compostagem, relacionando ao final a maturação do composto obtido (GUIDONI et al., 2018).

CONCLUSÃO

O lodo de pescado salino de estação de tratamento de efluentes, independente dos tratamentos obteve uma porcentagem alta de carbono e muito baixa de nitrogênio, conteúdo que pode servir para estudos futuros para investigar um equilíbrio de v/v a ser estudado para ser corrigido essa deficiência, ou adição de algum outro resíduo agroindustrial rico em nitrogênio para haver esse equilíbrio C/N, assim como estipular um tempo de compostagem maior que 26 dias de incubação. Porém o comportamento das cepas aplicadas nos tratamentos, tiveram melhores resultados para os demais parâmetros avaliados. Sendo assim, a aplicação de cepas consideradas halotolerantes podem ser uma alternativa para a compostagem de um resíduo altamente salino, auxiliando a degradação de matéria orgânica e assessorar a atividade microbiana natural.

REFERÊNCIAS

AOAC **International. Official methods of analysis.** Gaithersburg: Published by AOAC International. ed. 16, v.2, 1997.

Bernal, M. P.; Albuquerque, J. A.; Moral, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology.** n.100, p.5444-5453, 2009.

Bougouffa, S.; Rodovanovic, A.; Essa, K. M.; Bojic, V. B. DEOP: a database on osmoprotectants and associated pathways. **Database.** v.2014, 2014.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa** nº25 de 23 de julho de 2009.

Corrêa, E. K.; Junior, T. L.; Gil-Turnes, C.; Corrêa, M. N.; Bianchi, I.; Corezzolla, J. L.; ; Ulguim, R. R. Efeito de diferentes profundidades de cama sobre parâmetros ambientais para suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** v. 12, p. 540-545, 2008.

Corrêa, E. K.; Bianchini, I.; Lucia JR, T.; Corrêa, L. B.; Marques, R. V.; Paz, M. F. Composting basics. In: Corrêa, E. K.; Corrêa, L. B. **Solidwaste Management**. p.279, 2012.

Diaz, M. P.; Boyd, K. G.; Grigson, S. J. W.; Burgess, J. G. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnology. Bioengineering**. v.79, n.2, p.145–153, 2002.

Guidoni, L. L. C.; Becker, R. V. B.; Marques, R. V.; Corrêa, L. B.; Corrêa, E. K. Compostagem domiciliar. In: CORRÊA, E. K.; CORRÊA, L. B. **Gestão de Resíduos Sólidos**. Porto Alegre: Ed. Evangraf, cap. 7, p.117-141, 2012.

Guidoni, L. L. C.; Marques, R. V.; Moncks, R. B.; Botelho, F. T.; da Paz, M. F.; Corrêa, L. B.; Corrêa, E. K. Home composting using diferente ratios of bulking agente to food waste. **Journal of Environmental Management**. v.207, p.141-150, 2018.

Kiehl, E. J. **Manual de Compostagem: Maturação e Qualidade do Composto**; Piracicaba: 4^oed, p.173, 2004.

Lefebvre, O.; Moletta, R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. **Water Research**. v.40, n.20, p.3671-3682, 2006.

Li, Z.; Lu, H.; He, L. H. Experimental and modeling approaches for food waste composting: a review. **Chemosphere**. v.93, n.7, p. 1247-1257, 2013.

Lu, F.; He, P.; Shao, L.; Lee, D. Effects of ammonia on hydrolysis of proteins and lipids from fish residues. **Applied Microbiology and Biotechnology**. n.75, p.1201-1208, 2007.

Marques, R. V.; Azambuja, H. G. P.; Perius, D. B.; Bittencourt, G. A.; Moncks, R. B.; Corrêa, E. K.; Santo, M. L. P. Canned anchoita (*Engraulis Anchoita*): Technological process and sensory analysis – an alternative for human feed. **American Journal of Food Science and Technology**. v.1, n.3, p.18-24, 2013.

Martín, J.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Pharmaceutically active compounds in sludge stabilizations treatments: Anaerobic and aerobic digestion, wastewater stabilization ponds and composting. **Science of the Total Environment**. v.503, p.97-104, 2015.

Mauriello, G.; Casaburi, A.; Blaiotta, G.; Villani, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**. v.67, p.149-158, 2004.

Morero, B.; Rodriguez, M.; Campanella, E. A. Environmental impact assessment as a complement of life cycle assessment. Case study: Upgrading of biogas. **Bioresource Technology**. n. 190, p. 402-407, 2015.

Pizarro, J.; Vergara, P. M.; Cerda, S.; Briones, D. Cooling and eutrophication of southern Chilean lakes. **Science of the Total Environment**. n. 541, p. 683-691, 2016.

Raj, D.; Antil, R. S. Evaluation of maturity and stability parameters of composts prepared from agro-industrial waste. **Bioresource Technology**. n.102, p.2868-2873, 2011.

Rasapoor, M.; Adl, M.; Pourazizi, B. Comparative evaluation of aeration methods for municipal solid waste composting from the perspective of resource management: A practical case study in Tehran, Iran. **Journal of Environmental Management**. v.184, p.528-534, 2016.

Sabiha, N.; Salim, R; Rahman, S; Rola-Rubzen, M. F. Measuring environmental sustainability in agriculture: A composite environmental impact index approach. **Journal of Environmental Management**. n.166, p.84-93, 2016.

Schmidhuber, J.; Tubiello, F. N. Global food security under climate change. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. v.104, n.50, p. 19703-19708, 2007.

Sellami, F.; Jarboui, R.; Hachicha, K.; Medhioub, E. A. Co-composting of oil exhausted olive-cake, poultry manure and industrial residues of agro-food activity for soil amendment. **Bioresource Technology**. v.99, p.1177-1188, 2008.

Serrano, A.; Siles, J. A.; Chica, A. F.; Martín, M. A. Agri-food waste valorization through anaerobic co-digestion: fish and strawberry residues. **Journal of Cleaner Production**. n.54, p.125-132, 2013.

Sivakumar, K.; Kumar, V. R. S.; Jagatheesan, P. N. R.; Viswanathan, K.; Chandrasekaran, D. Seasonal variations in composting process of dead poultry bird. **Bioresource Technology**. v.99, n.9, p.3708-3713, 2008.

Tan, C.; Zeyu, Z.; Rong, H.; Ruihong, M.; Hongtao, W.; Wenking, L. Adsorption of cadmium by biochar derived from municipal sewage sludge: Impact factors and adsorption mechanism. **Chemosphere**. n.134, p.286-293, 2015.

Tedesco, J. M.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S. **Análise de solo plantas e outros materiais**. Porto Alegre. Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia, UFRGS, p.174, 1995.

Valente, B. S.; Xavier, E. G.; Morselli, T. B. G. A.; Jahnke, D. S.; Brum, Jr.; Cabrera, B. R.; Moraes, P. de O.; Lopes, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Revista Archivos de Zootecnia**. v.58, p.59-85, 2009.

Vicentini, L. S.; Carvalho, K.; Richter, A. S. Utilização de microorganismos eficazes no preparo da compostagem. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.4, n.2, p.3367-3370, 2009.

Wu, C.; Li, W.; Wang, K.; Li, Y. Usage of pumice as bulking agent in sewage sludge composting. **Bioresource Technology**. n.190, p.516-521, 2015.

Yañes, R.; Alonso, J. L.; Días, M. J. Influence of bulking agente on sewage sludge composting process. **Bioresource Technology**. n.100, p.5827-5833, 2009.

6. REFERÊNCIAS

AOAC International. **Official methods of analysis**. Gaithersburg: Published by AOAC International. ed. 16, v.2, 1997.

Araujo, T. R.; Schoeler, G. P.; Marques, R. V.; Voloski, F. L. S.; Durval, E. H.; Neves, W. T.; Corrêa, L. B.; Corrêa, E. K. Potential use of cod isolated bacteria (Gadus sp.) for treatment of saline residues and effluents. **International Journal of Development Research**. v.7, n.9, p.15189-15193, 2017.

Associação Brasileira De Normas Técnicas. NBR 10004: **Resíduos sólidos – Classificação**. Rio de Janeiro, 2004.

Baron, F.; Cochet, M. F.; Pellerin, J. L.; BEN ZAKOUR, N. O. U. R. I.; Lebon, A.; Navarro, A.; Proudly, I.; Le Louir, Y.; Gautier, M. (2004). Development of a PCR test to differentiate between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Food Protection**. v.67, n.10, p.2302-2305, 2004.

Bernal, M. P.; Albuquerque, J. A.; Moral, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. **Bioresource Technology**. n.100, p.5444-5453, 2009.

Bhagowati, P.; Pradhan, S.; Dash, H. R.; Das, S. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by *Bacillus* spp. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v.79, n.9, p.1454-1463, 2015.

Bougouffa, S.; Rodovanovic, A.; Essa, K. M.; Bojic, V. B. DEOP: a database on osmoprotectants and associated pathways. **Database**. v.2014, 2014.

Brás, A.; Costa, R. Influence of brine salting prior to pickle salting in the manufacturing of various salted-dried fish species. **Journal of Food Engineering**. v.100, n.3, p.490-495, 2010.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em dezembro, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes> . Acessado em 28 abr. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Módulo 4 Gram-positivos, *Streptococcus* spp.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/intr_stre.htm . Acesso em: 28 abr. 2018.

BRASIL. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução normativa nº25** de 23 de julho de 2009.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm. Acesso em: 20 mar. 2018.

BRASIL. Lei nº 12.305 de 2 de agosto de 2010. Institui a **Política Nacional de Resíduos Sólidos**; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº481, de 03 de outubro de 2017. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=728>. Acesso em: 14 jun. 2018.

Brito, L. M.; Amaro, A. L.; Mourão, I.; Coutinho, J. Transformation of organic matter and nitrogen during composting of the solid fraction of cattle slurry. **Brazilian Journal of Soil Science**. v.32, p.1959-1968, 2008.

Campos, M.; Gonçalves, P. M. B.; de Camargo Júnior, F. B.; de Andrade, J. P.; Gaspar, L. R. **Photochemistry and Photobiology**. v.88, n.3, p.748-752, 2011.

Carignatto, C. R. R.; Oliveira, K. S. M.; De Lima, V. M. G; Neto, P. O. New culture médium to xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. **Indian Journal of Microbiology**. v.51, n.3, p.283-288, 2011.

Chandrasekaran, S.; Pugazhendi, A.; Banu, R. J.; Ismail, I. M. I.; Qari, H. A. Biodegradation of phenol by moderately halophilic bacterial consortium. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, 2017.

Corrêa, E. K.; Bianchini, I.; Lucia JR, T.; Corrêa, L. B.; Marques, R. V.; Paz, M. F. Composting basics. In: Corrêa, E. K.; Corrêa, L. B. **Solidwaste Management**. p.279, 2012.

Corrêa, E. K.; Junior, T. L.; Gil-Turnes, C.; Corrêa, M. N.; Bianchi, I.; Corezzolla, J. L.; ; Ulguim, R. R. Efeito de diferentes profundidades de cama sobre parâmetros ambientais para suínos em crescimento e terminação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 12, p. 540-545, 2008.

Craven, H. M.; Eyles, M. J.; Davey, J. A. Enteric indicator organisms in foods. In: Hocking, A. D.; Arnold, G.; Jenson, I.; Newton, K.; Sutherland, P. **Foodborne Microorganisms of Public Health Significance**. Sydney, Australia, Australian Institute of Food Science and Technology Inc. Chapter 5, 1997, p.139-168.

Diaz, M. P.; Boyd, K. G.; Grigson, S. J. W.; Burgess, J. G. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. **Biotechnology. Bioengineering**. v.79, n.2, p.145–153, 2002.

Díaz-Cárdenas, C.; Cantillo, A.; Rojas, L. Y.; Sandoval, T.; Fiorentino, S.; Robles, J.; Ramos, F. A.; Zambrano, M. M.; Baena S. Microbial diversity of saline environments: Searching for cytotoxic activities. **AMB Express**. v.7, n.1, p.223, 2017.

Duan, J.; Frang, H.; Su, B.; Chen, J.; Lin, J. Characterization of halophilic heterotrophic nitrification-aerobic dinitrification bacterium and its application on treatment of saline wastewater. **Bioresource Technology**. v.179, p.421-428, 2015.

Esparis, C. M.; Teixeira, L. M.; Irino, K.; Gil, P. F.; Almeida, M. T. B.; Lopes, G. S.; Bravo, V. L. R.; Pacheco, R. S. Regua-Mangia, A. H. Aspectos biológicos e moleculares de amostras uropatogênicas de *Escherichia coli* isoladas na cidade do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39, n.6, p.573-576, 2006.

Essghaier, B.; Fardeau, M. L.; Cayol, J. L.; Hajloui, M. R.; Boudabous, A.; Jijakli, H.; Sadfi-Zouaoui, N. Biological control of grey mould in strawberry fruit by halophilic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.833-846, 2009.

Ferreira, Sara Isabel Fernandes. **Estudo microbiológico da demolha do bacalhau salgado verde**. 2014. 64f. Dissertação (Mestrado integrado em Engenharia Biológica – Tecnologia Química e Alimentar) - Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2014.

Filho, E. S. A.; Sigarini, C. de O.; Valente, A. M.; Andrade, P. F.; de Oliveira, L. A. T.; Franco, R. M.; Carvalho, J. C. A. do P. Presença de microrganismos indicadores de condições higiênicas, e de patógenos em bacalhau saithe (*Pollacius virens*) salgado seco, comercializado no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v.11, n.3, p.171-173, 2004.

Guidoni, L. L. C.; Becker, R. V. B.; Marques, R. V.; Corrêa, L. B.; Corrêa, E. K. Compostagem domiciliar. In: CORRÊA, E. K.; CORRÊA, L. B. **Gestão de Resíduos Sólidos**. Porto Alegre: Ed. Evangraf, cap. 7, p.117-141, 2012.

Guidoni, L. L. C.; Marques, R. V.; Moncks, R. B.; Botelho, F. T.; da Paz, M. F.; Corrêa, L. B.; Corrêa, E. K. Home composting using diferente ratios of bulking agente to food waste. **Journal of Environmental Management**. v.207, p.141-150, 2018.

Guinebretière, M. H.; Auger, S.; Galleron, N.; Contzen, M.; De Sarrau, B.; De Buyser, M. L.; Lamberet, G.; Fagerlund, A.; Granum, P. E.; Lereclus, D.; De Vos, P.; Nguyen-The, C.; Sorokin, A. *Bacillus cytotoxicus* sp. Nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.63, p.31-40, 2013.

Gutiérrez-Arnillas, E.; Rodríguez, A.; Sanromán, M. A.; Deive, F. J. New sources of halophilic lipases: isolation of bactéria from Spanish and Turkish saltworks. **Biochemical Engineering Journal**. v.109, p.170-177, 2016.

Haakensen, M.; Dobson, C. M.; Hill, J. E.; Ziola, B. Reclassification of *Pediococcus dextrinicus* (Coster & White 1964) as *Lactobacillus dextrinicus* comb. Nov., and emended description of the genus *Lactobacillus*. **International Journal Sysematic and Evolutionary Microbiology**, p.615-621, 2009.

Huang, C., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., Cheng, M., Wan, J., Hu, L., Zhang, Y. Effect of *Phanerochaete chrysosporium* inoculation on bacterial

community and metal stabilization in lead-contaminated agricultural waste composting. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 294-303, 2017.

IPEA. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada**. Diagnóstico dos Resíduos Sólidos Industriais: Relatório de Pesquisa. Brasília, 2012.

ISO 6887-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions**, 1st ed. The International Organization for Standardization, 1999.

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

Karlsen, B. O.; Klingan, K.; Emblem, A.; Jorgensen, T. E.; Jueterbock, A.; Furmanek, T.; Hoarau, G.; Johansen, S. D.; Nordeide, J. T.; Moum, T. Genomic divergence between the migratory and stationary ecotypes of Atlantic cod. **Molecular ecology**. v.22, n. 20, p.5098-5111, 2013.

Kiehl, E. J. **Manual de Compostagem: Maturação e Qualidade do Composto**; Piracicaba: 4^oed, p.173, 2004.

Kim, M.; Park, S. Y.; Park, T. J.; Ha, S. Effect of sodium chloride on the reduction of *Bacillus cereus* in shrimp *Jeotgal* during refrigerated storage. **Journal Food Safety**. v.37, n.1, 2017.

Lefebvre, O.; Moletta, R. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. **Water Research**. v.40, n.20, p.3671-3682, 2006.

Lefebvre, O.; Vasudevan, N.; Torrijos, M.; Thanasekaran, K.; Moletta, R. Halophilic biological treatment of tannery soak liquor in a sequencing batch reactor. **Water Research**. v.39, n.8, p.1471–1480, 2005.

Li, W.; Yu, H.; Rittmann, B. E. Chemistry: Reuse water pollutants. **Nature News**, v.528, n.7580, p.29, 2015.

Li, Z.; Lu, H.; He, L. H. Experimental and modeling approaches for food waste composting: a review. **Chemosphere**. v.93, n.7, p. 1247-1257, 2013.

Logan, N. A.; Devos, P. Genus Bacillus. In: Devos, P.; Garrity, G. M.; Jones, D.; Krieg, N. R.; Ludwig, W.; Rainey, F. A.; Schleifer, K. H.; Whitman, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2nd ed. v.3. New York, Springer. p. 21-128, 2009.

López, N. I.; Pettinari, M. J.; Nikel, P. I.; Méndez, B. S. Polyhydroxyalkanoates much more than biodegradable plastics. **Advances in Applied Microbiology**. Academ Press. v.93, p.73-106, 2015.

Lu, F.; He, P.; Shao, L.; Lee, D. Effects of ammonia on hydrolysis of proteins and lipids from fish residues. **Applied Microbiology and Biotechnology**. n.75, p.1201-1208, 2007.

Marques, R. V.; Azambuja, H. G. P.; Perius, D. B.; Bittencourt, G. A.; Moncks, R. B.; Corrêa, E. K.; Santo, M. L. P. Canned anchoita (*Engraulis Anchoita*): Technological process and sensory analysis – an alternative for human feed. **American Journal of Food Science and Technology**. v.1, n.3, p.18-24, 2013.

Martín, J.; Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E. Pharmaceutically active compounds in sludge stabilizations treatments: Anaerobic and aerobic digestion, wastewater stabilization ponds and composting. **Science of the Total Environment**. v.503, p.97-104, 2015.

Martinez-Alvarez, O.; Gómez-Guillén, C. Influence of mono – and divalent salts on water loss and properties of dry salted cod fillets. **LWT – Food Science and Technology**. v.53, n.2, p.387–394, 2013.

Mauriello, G.; Casaburi, A.; Blaiotta, G.; Villani, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**. v.67, p.149-158, 2004.

Melián-Martel, N.; Sadhwani, J. J.; Báez, S. O. P. Saline waste disposal reuse for desalination plants for the chlor-alkali industry: The particular case of pozo izquierdo SWRO desalination plant. **Desalination**, v.281, p.35-41, 2012.

Mendes, P. M., Becker, R., Corrêa, L. B., Bianchi, I., Dai Prá, M. A., Lucia, T. JR., Corrêa, E. K. Phytotoxicity as an indicator of stability of broiler production residues. **Journal of Environmental Management**. v.167, p.156-159, 2016.

Morero, B.; Rodriguez, M.; Campanella, E. A. Environmental impact assessment as a complement of life cycle assessment. Case study: Upgrading of biogas. **Bioresource Technology**. n. 190, p. 402-407, 2015.

Morton, R. D. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001.

Parry, D. L. Analyzing food waste management methods. **Biocycle**. v. 54, n.

Partanen, P.; Hultman, J.; Paulin, L.; Auvinen, P.; Romanstschuck, M. Bacterial diversity at different stages of the compostings process. **BMC Microbiology**. v.10, p.1-11, 2013.

PICOLOTTO, Patrícia Regina Dhein. **Expressão de genes codificadores de versões truncadas da uréase de *Canavalia ensiformis* em plantas**. 2014. 45 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia Bacharelado) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

Piñar, G.; Krakova, L.; Pangallo, D.; Piombino-Mascali, D.; Maixner, F.; Zink, A.; Sterflinger, K. Halophilic bacteria are colonizing the exhibition areas of the Capuchin Catacombs in Palermo, Italy. **Extremophiles**. v.18, p.677–691, 2014.

Pizarro, J.; Vergara, P. M.; Cerda, S.; Briones, D. Cooling and eutrophication of southern Chilean lakes. **Science of the Total Environment**. n. 541, p. 683-691, 2016.

Pugazhendi, A.; Qari, H; Basahi, J. M. A. B.; Godon, J. J.; Dhavamani, J. Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and treatment of petroleum wastewater at extreme conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v.121, p.44-54, 2017.

Rai, K. A.; General, T.; Bhaskar, N.; Suresh, P. V.; Sakhare, P. Z.; Halami, P. M.; Gowda, L. R.;Mahendrakar, N. S. Utilization of tannery fleshings: Optimization of

conditions for fermenting delimed tannery fleshings using *Enterococcus faecium* HAB01 by response surface methodology. **Bioresource Technology**. v.101, n.6, p.1885-1891, 2010.

Raj, D.; Antil, R. S. Evaluation of maturity and stability parameters of composts prepared from agro-industrial waste. **Bioresource Technology**. n.102, p.2868-2873, 2011.

Rasapoor, M.; Adl, M.; Pourazizi, B. Comparative evaluation of aeration methods for municipal solid waste composting from the perspective of resource management: A practical case study in Tehran, Iran. **Journal of Environmental Management**. v.184, p.528-534, 2016.

Ryser, E. T.; Schuman, J. D. Mesophilic aerobic plate count. In: Salfinger, Y.; Tortorello, M. L. (eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5th ed. American Public Health Association, Washington, D. C., 2015. Chapter 8, p.95-101.

Sabiha, N.; Salim, R.; Rahman, S.; Rola-Rubzen, M. F. Measuring environmental sustainability in agriculture: A composite environmental impact index approach. **Journal of Environmental Management**. n.166, p.84-93, 2016.

Sadfi-Zouaoui, N.; Essghaier, B.; Hajlaoui, M. R.; Fardeau, M. L.; Cayol, J. L.; Ollivier, B.; Boudabous, A. Ability of moderately halophilic bacteria to control Grey mould disease on tomato fruits. **Journal Phytopathol**. v.156, p.42–52, 2008.

Saleem, M.; Ahmad, S.; Ahmad, M. Potential of *Bacillus cereus* for bioremediation of pulp and paper industrial waste. **Annals of Microbiology**. v.64. p.823-829, 2014.

Salloto, G. R. B.; Pinto, L. H.; Lima, J. L.; Vieira, R. P.; Cardoso, A. M.; Martins, O. B.; Clementino, M. M. A biologia das arqueias halofílicas e seu pontencial biotecnológico. **Revista Brasileira de Biociência**. v.10, n.2, p.226-234, 2012.

Sambrook, J.; Russell, D. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. Third Edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press v.1, Chapter 6, Protocol 7, 2001.

Schmidhuber, J.; Tubiello, F. N. Global food security under climate change. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**. v.104, n.50, p. 19703-19708, 2007.

Schubert, B. A.; Lowenstein, T. K.; Timofeeff, M. N.; Parker, M. A. How do prokaryotes survive in fluid inclusions in halite for 30 ky? **Geology**. v.37, n12, p.1059-162, 2009.

Sebastião, F. D. A.; Furlan, L.; Hashimoto, D. T.; Pilarski, F. Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene sequencing. **Advances in Microbiology**, p. 409–424, 2015.

Sellani, F.; Jarboui, R.; Hachicha, K.; Medhioub, E. A. Co-compostinf of oil exhausted olive-cake, poultry manure and industrial residues of agro-food activity for soil amendment. **Bioresource Technology**. v.99, p.1177-1188, 2008.

Serrano, A.; Siles, J. A.; Chica, A. F.; Martín, M. A. Agri-food waste valorization through anaerobic co-digestion: fish and strawberry residues. **Journal of Cleaner Production**. n.54, p.125-132, 2013.

Silva, N.; Taniwaki, M. H.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A.; Nascimento, M. S.; Gomes, R. A. R. **Microbiological Examination Methods of Food and Water – A Laboratory Manual**. The Netherlands: CRC Press/Balkema. Chapter13, 2013, p.137-149.

Sivakumar, K.; Kumar, V. R. S.; Jagatheesan, P. N. R.; Viswanathan, K.; Chandrasekaran, D. Seasonal variations in composting process of dead poultry bird. **Bioresource Technology**. v.99, n.9, p.3708-3713, 2008.

Sperber, W. A.; Moorman, M. A.; Freier, T. A.; Cultural methods for the enrichment and isolation of microorganisms. In: SALFIRNGER, Y. & TORTORELLO, M. L. Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods. **American Public Health Association (APHA)**. Chapter 5, 2015, p.67-73.

Tan, C.; Zeyu, Z.; Rong, H.; Ruihong, M.; Hongtao, W.; Wenking, L. Adsorption of cadmium by biochar derived from municipal sewage sludge: Impact factors and adsorption mechanism. **Chemosphere**. n.134, p.286-293, 2015.

Tedesco, J. M.; Gianello, C.; Bissani, C. A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S. **Análise de solo plantas e outros materiais**. Porto Alegre. Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia, UFRGS, p.174, 1995.

Tortora, Gerard. J.; Funke, Berdell. R.; Case, Christine. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 31p.

Valente, B. S.; Xavier, E. G.; Morselli, T. B. G. A.; Jahnke, D. S.; Brum, Jr.; Cabrera, B. R.; Moraes, P. de O.; Lopes, D. C. N. Fatores que afetam o desenvolvimento da compostagem de resíduos orgânicos. **Revista Archivos de Zootecnia**. v.58, p.59-85, 2009.

Valente, B. S.; Xavier, E. G.; Lopes, M.; Pereira, H. da S.; Roll, V. F. B. Composting and vermicomposting of dairy cattle residues and poultry bed. **Zootechnical Archives Magazine**. v.65, n.249, p.79-88, 2016.

Vaz, G. C.; Bahia, A. P. C. O.; De Figueiredo Muller Ribeiro, F. C.; Xavier, C. H.; Patel, K. P.; Santos, R. A. S.; Fontes, M. A. P. Cardiovascular and behavioral effects produced by administration of liposome-entrapped GABA into the rat central nervous system. **Neuroscience**. v.285, p.60-69, 2015.

Vicentini, L. S.; Carvalho, K.; Richter, A. S. Utilização de microorganismos eficazes no preparo da compostagem. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v.4, n.2, p.3367-3370, 2009.

Won, S. G.; Park, J. Y.; Rahman, M. M.; Park, K. H.; Ra, C. S. Co-composting of swine mortalities with swine manure and sawdust. **Compost Science and Utilization**. v.24, n.1, p.42-53, 2016.

Wu, C.; Li, W.; Wang, K.; Li, Y. Usage of pumice as bulking agent in sewage sludge composting. **Bioresource Technology**. n.190, p.516-521, 2015.

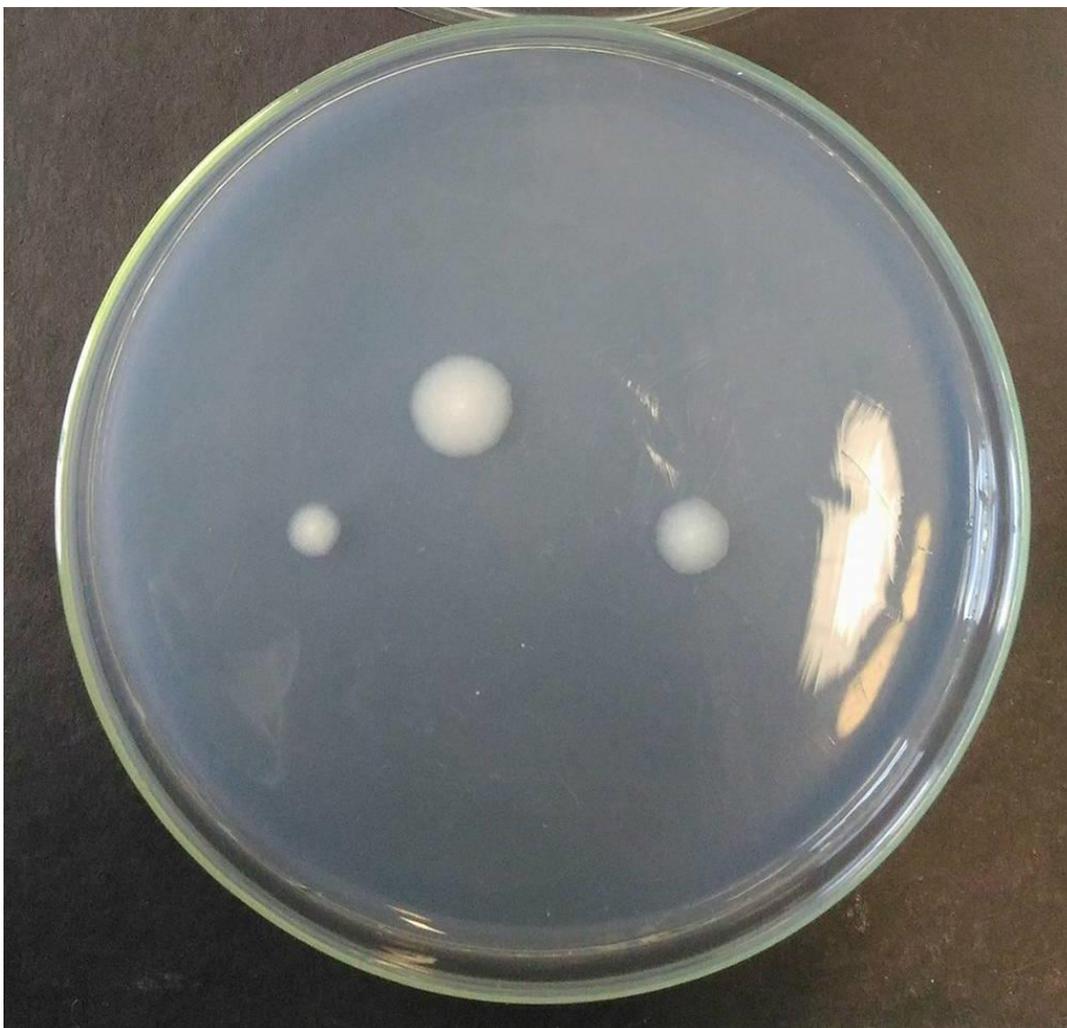
Yañes, R.; Alonso, J. L.; Días, M. J. Influence of bulking agente on sewage sludge composting process. **Bioresource Technology**. n.100, p.5827-5833, 2009.

Yeannes, M. I.; Ameztoy, I. M.; Ramirez, E. E.; Felix, M. M. Culture alternative medium for the growth of extreme halophilic bacteria in fish products. **Food Science and Technology**. v.31, n.3, p.561-566, 2011.

Zardeto, G.; Guillen, F. O.; Camacho, D. F. Pesquisa de Streptococcus agalactiae em gestantes como rotina laboratorial de exames pré-natais. **Revista Uningá**. v.42, p.77-84, 2014.

Apêndices

Apêndice A – Imagem de colônias de *Enterococcus faecalis* em Ágar Padrão de Contagem (PCA).



Apêndice B – Imagem de colônias de *Bacillus cereus* em Ágar Padrão de Contagem (PCA).



Apêndice C – Imagem dos biorreatores em estufa no processo de microcompostagem controlada.



Apêndice D – Tabela do resumo estatístico do experimento realizado no capítulo III deste trabalho.

Variáveis	Modelo			GL	F	P	
	Intercepto	x	x ²				
pH	EF	8,0413	0,0629	*	19	25,2732	<0,0001
	BC	7,9529	-0,0151	*	17	52,499	<0,0001
	PL	7,8629	-0,0176	*	16	120,3259	<0,0001
	CN	8,2717	-0,0066	*	17	1,2213	0,2855
	CP	7,9884	-0,0248	*	19	34,3292	<0,001
CE	EF	15,533	0,6476	-0,0173	19	15,0114	0,0002
	BC	15,3564	0,5848	-0,0153	17	15,2333	0,0002
	PL	15,9658	0,5685	-0,0174	16	7,2665	0,0068
	CN	1,5334	0,0456	*	19	17,2641	0,0006
	CP	17,0793	0,328	*	17	11,1702	0,0041
MM	EF	22,6416	1,7715	-0,0437	18	56,8753	<0,0001
	BC	22,5289	1,7639	-0,0481	19	56,2809	<0,0001
	PL	23,4285	1,3952	-0,0382	18	33,5701	<0,0001
	CN	15,0167	2,9822	-0,0772	19	63,4844	<0,0001
	CP	22,3176	2,2971	-0,056	17	36,6705	<0,0001
N	EF	1,1743	-0,0109	*	17	3,0142	0,1018
	BC	0,5918	0,0846	-0,0033	18	10,5538	0,0012
	PL	1,18	-0,176	*	16	10,0723	0,0063
	CN	1,5913	-0,0225	*	17	13,4954	0,0021
	CP	1,2877	-0,0156	*	18	8,2639	0,0105
U	EF	43,2291	3,1162	-0,0847	19	65,7036	<0,0001
	BC	43,8252	2,5962	-0,0716	19	72,885	<0,0001
	PL	43,9079	2,4028	-0,0693	19	44,411	<0,0001
	CN	39,6788	5,7026	-0,149	19	115,9397	<0,0001
	CP	41,4084	4,1307	-0,0981	19	32,6521	<0,0001

Legenda: * = não foi estimado modelo polinomial de segunda ordem ; GL = graus de liberdade; F = calculado por ANOVA; P = probabilidade.