

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

BIODEGRADAÇÃO E FORMULAÇÃO DE MEIO DE CULTURA USANDO ESCAMA
DE PEIXE COMO SUBSTRATO

JÉSSICA FERREIRA MAFRA
Bacharela em Biologia

CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2017

JÉSSICA FERREIRA MAFRA

BIODEGRADAÇÃO E FORMULAÇÃO DE MEIO DE CULTURA USANDO ESCAMA
DE PEIXE COMO SUBSTRATO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sob orientação da professora Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto e co-orientação do professor Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira, como parte das exigências do Curso de Graduação de Bacharelado em Biologia, para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

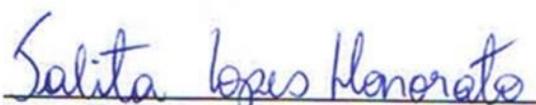
CRUZ DAS ALMAS
BAHIA - BRASIL
2017

JÉSSICA FERREIRA MAFRA

BIODEGRADAÇÃO E FORMULAÇÃO DE MEIO DE CULTURA USANDO ESCAMA
DE PEIXE COMO SUBSTRATO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, sob orientação da professora Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto e co-orientação do professor Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira, como parte das exigências do Curso de Graduação de Bacharelado em Biologia, para obtenção do título de Bacharel em Biologia.

APROVADO: 05de abril de 2017


Talita Lopes Honorato – DS
UFRB


Phellippe Arthur Santos Marbach – DS
UFRB


Norma Suely Evangelista-Barreto – DS
Orientador
UFRB

*Aos meus pais, Solange e Rubens, sem
cujo entusiasmo este trabalho ainda
estaria inacabado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades na vida.

A minha mãe, Solange pelo amor incondicional e irrevogável, paciência e estímulo aos estudos.

Ao meu pai, Rubens por todo o ensinamento, dedicação e apoio.

As minhas irmãs, Lorena, Érica, Grasielle e Jaqueline, pela força para enfrentar os desafios.

A toda a minha família, minha base de confiança, respeito e simplicidade.

A professora Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto pela orientação, paciência, confiança, ensinamentos, oportunidades, incentivo e acolhimento em seu laboratório.

Aos meus co-orientadores, Me. Camila, professor Thiago e professora Elizabeth pelos ensinamentos, conselhos e paciência.

As minhas amigas Rebeca e Sarah, que nunca se fizeram ausentes, apesar da distância.

A todos os amigos que conquistei durante a graduação.

A toda equipe do LABMAA, pelo carinho, ajuda, companheirismo e alegria, indispensáveis durante todos esses anos e que sempre lembrarei com muita saudade.

A todos os professores do Curso de Bacharelado em Biologia pelos valiosos ensinamentos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, pela oportunidade de realização do Curso.

À FAPESB, CNPq e UFRB pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que não foram citados mas de alguma forma contribuíram para a concretização deste sonho, muito obrigado!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Microrganismos utilizados nos ensaios de degradação das escamas de peixe 29

Tabela 2. Percentual médio do rendimento da degradação de escamas de tilápia por bactérias do gênero *Bacillus* 30

Tabela 3. Variação da média de pH durante a degradação de escama de tilápia por isolados bacterianos no início e no final da degradação 30

Tabela 4. Identificação molecular de *Bacillus subtilis* proveniente de resíduos de escamas 31

CAPÍTULO II

Tabela 1. Crescimento de *Bacillus subtilis* (UFC/mL) utilizando diferentes meios a base de escama de peixe e caldo nutriente 43

Tabela 2. Velocidade específica de crescimento (μ), tempo de geração (t_g) e duração da fase exponencial da cultura de *Bacillus subtilis* em três meios de cultura diferentes 46

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1. Curvas de crescimento referentes ao cultivo de *Bacillus subtilis* em caldo escama de peixe, caldo hidrolisado proteico de escama de peixe e caldo comercial (Caldo C1, caldo C2 e caldo nutriente) 43
- Figura 2. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultura usando como fonte de carbono escama de peixe (Caldo C1) 44
- Figura 3. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultura usando hidrolisado protéico de escamas de peixe (Caldo C2) 44
- Figura 4. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultura comercial, caldo nutriente 45

RESUMO

MAFRA, JÉSSICA FERREIRA, Bacharel em Biologia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, abril de 2017. Formulação de meio de cultura usando escama de peixe como substrato. Orientador: Norma Suely Evangelista-Barreto. Co-Orientador: Thiago Alves Santos de Oliveira.

A crescente industrialização do pescado tem gerado grandes quantidades de resíduos sólidos. Dentre esses resíduos estão as escamas, material abundante, rico em proteínas e de baixo custo, que muitas vezes são descartados de forma incorreta, causando danos ambientais. A transformação de resíduos em subprodutos é a base do desenvolvimento sustentável e garante processos mais econômicos e de menor impacto ambiental. As necessidades nutricionais das células microbianas têm sido supridas nos laboratórios de pesquisa e/ou clínicos por diferentes meios de cultura, no entanto, o elevado valor desses meios dificultam a realização das atividades laboratoriais. O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de escamas de peixe, bem como testar diferentes formulações de meio de cultura a base de escama de peixe em substituição a formulação de meios de culturas comerciais no crescimento de *Bacillus subtilis*. Para isso o trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na etapa 1 (ensaios de degradação) inóculo de 1 mL (10^8 UFC/mL) dos isolados de *Bacillus* (B1, B2, B3 e B4) foram transferidos para *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 60 mL de meio mínimo mineral (suplementado com 1% de glicose e 1% de extrato de levedura), adicionado de 1g de escamas de peixe, incubados por seis dias a 125 rpm e temperatura controlada de 37 °C. Além disso, o pH foi medido no início e no final da degradação. Na segunda etapa foram formulados dois meios de cultivo a base de escamas, caldo C1 (5g de escamas trituradas, 5g de glicose, 1,5g de extrato de levedura, 5g de cloreto de sódio e 1000 mL de água destilada) e caldo C2 (hidrolisado de escamas proveniente da etapa de degradação). A eficiência dos meios formulados foi apresentada por meio da velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) e do tempo de duplicação, t_d (h) de *Bacillus subtilis* (B1). O rendimento da degradação usando escamas inteiras por isolados do gênero *Bacillus* variou de 12 a 21%. Já em relação a degradação usando escamas trituradas, o rendimento foi superior, variando de 13 a 26%. O isolado que apresentou maior rendimento na degradação usando escama inteira foi o B4 e na degradação usando escama triturada foi o isolado B1. Verificou-se também que o maior aumento de pH (7,8) ocorreu com o isolado B1, o qual apresentou maior taxa de degradação da escama. No caldo escama de peixe (caldo C1), o crescimento de *B. subtilis* (B1) apresentou maior velocidade específica de crescimento ($0,839 h^{-1}$), diferindo estatisticamente dos demais caldos e menor tempo de duplicação (49,57 min). No entanto, o crescimento em caldo hidrolisado proteico de escama de peixe (caldo C2) apresentou as fases de crescimento mais definidas e uma transição da fase exponencial para a fase estacionária mais gradual. Foi possível concluir que as linhagens de *Bacillus* apresentaram capacidade de degradação de substratos recalcitrantes a base de escama e que a bioconversão desse material por meio da fermentação é uma alternativa para reduzir a quantidade de resíduos sólidos industriais, sendo possível o aproveitamento de escama de peixe na formulação de meios de cultura em substituição aos meios comerciais disponíveis hoje no mercado.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, caldo nutriente, tempo de geração, crescimento microbiano, bioconversão

ABSTRACT

MAFRA, JÉSSICA FERREIRA, Bachelor of Biology, Federal University of Bahia Reconcavo, april 2017. Formulation of culture medium using fish scale as substrate. Advisor: Norma Suely Evangelista-Barreto. Co-Advisor: Thiago Alves Santos de Oliveira.

The increasing industrialization of fish has generated large amounts of solid waste. Among these residues are scales, abundant material, rich in proteins and low cost, which are often discarded incorrectly, causing environmental damage. The transformation of waste into byproducts is the basis of sustainable development and ensures processes that are more economical and have less environmental impact. The nutritional requirements of microbial cells have been supplied in research laboratories and / or clinics by different culture media, however, the high value of these means make it difficult to perform laboratory activities. The objective of the present work was to investigate the biotechnological potential of bacteria of the genus *Bacillus* in the degradation of fish scales, as well as to test different formulations of culture medium based on fish scale in substitution to the formulation of means of commercial cultures in the growth of *Bacillus Subtilis*. For this the work was developed in two stages. In stage 1 (degradation assays) 1 mL inoculum (108 UFC/mL) of the *Bacillus* isolates (B1, B2, B3 e B4) were transferred to Erlenmeyer's 250 mL containing 60 mL of minimal mineral medium (supplemented with 1% glucose and 1% yeast extract) and 1g of fish scale, incubation for six days at 125 rpm and temperature controlled at 37 ° C. In addition, the pH was measured at the beginning and at the end of the degradation. In the second step, two culture media were formulated with scales, C1 broth (5 g of crushed flakes, 5 g of glucose, 1.5 g of yeast extract, 5 g of sodium chloride and 1000 ml of distilled water) and C2 Hydrolysed from the degradation step). The efficiency of the formulated media was presented by means of the specific growth rate μ (h⁻¹) and the generation time, t_g (h) of *Bacillus subtilis* (B1). The degradation yield using whole scales by isolates of the genus *Bacillus* ranged from 12 to 21%. In relation to the degradation using crushed scales, the yield was higher, varying from 13 to 26%. The isolate that presented the highest yield in the degradation using whole scale was the B4 and in the degradation using crushed scale was the isolate B1. It was also verified that the highest pH increase (7,8) occurred with the isolate B1, which presented higher rate of scale degradation. In the fish stock broth (broth C1), the growth of *B. subtilis* (B1) showed a higher specific growth rate (0.839 h⁻¹), differing statistically from the other broths and lower generation time (49.57 min). However, growth in fish scale protein hydrolyzate broth (C2 broth) showed the most defined growth phases and a transition from the exponential phase to the more gradual stationary phase. It was possible to conclude that the *Bacillus* strains presented degradation capacity of recalcitrant substrates based on scale and that the bioconversion of this material through fermentation is an alternative to reduce the amount of industrial solid waste, being possible the use of fish scale in the formulation of culture media in place of the commercial means available on the market today.

Key-words: *Bacillus subtilis*, nutrient broth, generation time, microbial growth, bioconversion

ÍNDICE

	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	Produção de pescado no Brasil	14
3.2	Geração e aproveitamento dos resíduos	15
3.3	Escamas	16
3.4	Microrganismos queratinolíticos	17
3.5	Gênero <i>Bacillus</i>	17
3.6	Meio de crescimento microbiano	18
3.7	Enzimas microbianas	19
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
	CAPÍTULO I - DEGRADAÇÃO DAS ESCAMAS DE PEIXE POR BACTÉRIAS DO GÊNERO <i>Bacillus</i> spp.	23
1	ARTIGO 1	24
2	RESUMO	24
3	ABSTRACT	24
4	INTRODUÇÃO	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	Preparação das escamas in natura	26
5.2	Isolamento de <i>Bacillus</i> spp.	26
5.3	Seleção de bactérias degradadoras de escamas de peixe	26
5.4	Atividade proteolítica	27
5.5	Ensaio de degradação	27
5.6	Identificação dos isolados bacterianos	28
5.7	Análise estatística	29
6	RESULTADOS	29
7	DISCUSSÃO	31
8	CONCLUSÕES	33

	CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MEIOS FORMULADOS A PARTIR DE ESCAMAS POR MEIO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>Bacillus subtilis</i>	37
1	ARTIGO 2	38
2	RESUMO	38
3	ABSTRACT	38
4	INTRODUÇÃO	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	Obtenção das escamas de peixe	40
5.2	Microrganismo	40
5.3	Formulação dos meios de cultura	41
5.4	Condições de cultivo	41
5.4.1	Meio de cultura comercial	41
5.4.2	Meio de cultura formulado	41
5.5	Eficiência dos meios de cultura	42
5.6	Análise estatística	42
6	RESULTADOS	42
7	DISCUSSÃO	46
8	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53

1. INTRODUÇÃO

O processo de industrialização do pescado tem crescido de forma constante com o desenvolvimento de indústrias de beneficiamento. Esse avanço visa o aprimoramento e a obtenção de diferentes apresentações do pescado ao mercado consumidor, uma vez que esses produtos são importantes constituintes da dieta humana, com importante valor nutricional, como proteínas de alto valor biológico, vitaminas, minerais e lipídios do tipo ômega 3 (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Na industrialização do pescado é gerado grandes quantidades de resíduos sólidos que quando descartados de forma incorreta se tornam um problema sanitário e ambiental para os produtores e as indústrias. Os resíduos gerados são predominantemente constituídos de pequenos pedaços de peixes, vísceras, peles, nadadeiras e escamas, os quais podem chegar a 70% da matéria prima (BENITES; SOUZA-SOARES, 2010). Esses resíduos apresentam grande potencial quanto a sua reutilização como novas fontes (não convencionais e de baixo custo) em processos de bioconversão, resultando em uma atividade auto-sustentável. Além disso, o aproveitamento dos resíduos pode trazer diversos benefícios como a prevenção da degradação ambiental e prejuízo econômico, além da geração de empregos diretos e indiretos (SANTOS *et al.*, 2009b).

A Bahia ocupa a quarta colocação no *ranking* dos maiores produtores de tilápias cultivadas no país e com isso consegue ganhar expressividade na atividade. Os pólos de cultivo e processamento se multiplicam no país, e por ser um peixe originalmente de água doce, na Bahia, a tilápia também tem sido cultivada em região de estuário, área em que a água do mar se mistura à água de rio (RURAL CENTRO, 2012). Como a tilápia é comercializada principalmente na forma de filé in natura, tem sido uma questão de preocupação o destino final dos resíduos gerados (MARTINS *et al.*, 2015).

Atualmente, o destino das escamas de peixe tem sido quase sempre à produção de farinha, silagem ou artesanato, os quais não absorvem toda a produção gerada. Neste sentido, a escama revela-se um material abundante, de baixo custo e pouco explorado pela sociedade científica (SANTOS *et al.*, 2009a).

A transformação de materiais descartáveis e poluentes em subprodutos com valor agregado tende a ser a base para o desenvolvimento sustentável do mundo moderno, uma vez que, promover a reciclagem dos resíduos é primordial para a garantia de processos mais econômicos e com menor impacto ambiental (BENITES; SOUZA-SOARES, 2010).

As necessidades nutricionais das células microbianas tem sido supridas nos laboratórios de pesquisa ou clínicos por meio de uma variedade de meios de cultura, divididos em duas

categorias: os meios quimicamente definidos e os meios complexos. Os primeiros são formulados a partir de substâncias químicas puras orgânicas e/ou inorgânicas; enquanto os segundos (a composição química exata não é conhecida) são compostos por um número limitado de substâncias complexas (extratos de plantas ou de animais), como peptona, extratos de carne e de levedura (MADIGAN *et al.*, 2016).

As principais proteínas encontradas nas escamas de peixe são o colágeno e a queratina. As queratinas são proteínas fibrosas e insolúveis amplamente encontradas em animais vertebrados superiores, tendo como principal função, estrutural e de proteção, pois compõe pelos, peles, unhas, cascos, penas e escamas (NAGAI *et al.*, 2004). O colágeno ao ser extraído das escamas é hidrolisado, sendo conhecido como gelatina ou colágeno hidrolisado. A característica mais importante do colágeno hidrolisado é a sua composição de aminoácidos, principalmente glicina e prolina, dois aminoácidos essenciais para a estabilidade e a regeneração das cartilagens (SILVA; PENNA, 2012).

Portanto, as escamas se revelam um subproduto abundante, de fácil obtenção, de baixo custo e rico em proteínas. Além disso, em razão da necessidade de preservação ambiental e do retorno financeiro para a própria indústria geradora dos resíduos, a aplicação das escamas em processos biotecnológicos e sua utilização otimizada na produção de produtos com alto valor agregado se caracteriza como uma atividade sustentável e promissora (HUANG *et al.*, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o uso de escamas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) como fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento de *Bacillus subtilis*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar *Bacillus* sp. do intestino de peixe do gênero *Roeboides* (piranha) e de resíduos de escamas.
- Identificar os isolados de acordo com suas características morfo-moleculares;
- Realizar a conversão mecânica das escamas de tilápia por meio de autoclavagem e moedura;
- Investigar a capacidade de degradação de escamas de tilápia por isolados bacterianos do gênero *Bacillus*;
- Realizar a bioconversão das escamas de tilápia em hidrolisado proteico usando *Bacillus* spp.
- Formular meios de crescimento para *Bacillus subtilis* usando hidrolisado proteico e escamas de tilápia.
- Elaborar curva de crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* nos meios de cultura formulados;
- Verificar a eficiência dos meios formulados por meio da cinética de crescimento de *Bacillus subtilis*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção de pescado no Brasil

O Brasil tem se destacado como um dos principais produtores aquícolas do mundo. Somente em 2014 o montante acumulado pela produção aquícola total foi de 562,5 mil toneladas, representando um aumento de 10% em relação a 2010. Com essa produção o Brasil subiu para a 14ª posição entre os principais produtores aquícolas mundiais (FAO, 2016).

As atividades na área da piscicultura vêm se intensificando e apresentando destaque na economia brasileira como alternativa para pequenos e médios produtores e com isso promovendo a potencialização de ambientes, elevando sua produtividade (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A produção de pescado do nordeste foi a maior em 2011, registrando 454 mil toneladas e representando 31,7% da produção nacional. A Bahia se destaca no *ranking* brasileiro como a quarta Unidade da Federação com a maior produção de pescado marinho (BRASIL, 2011).

O Brasil apresenta grande potencial para a aquicultura devido ao clima tropical, favorável para o cultivo, extensa faixa litorânea, disponibilidade hídrica, grandes reservatórios continentais, amplo território, forte mercado interno e indústria de ração estabelecida, o que tem atraído investidores interessados tanto no cultivo de pescado como nos vários segmentos da cadeia de produção (KUBITZA, 2015).

Embora o Brasil venha ganhando destaque com a produção aquícola, em 2014 ocorreu diminuição da pesca de captura em águas continentais, o que é explicado pela crescente degradação ambiental observada nesses ambientes (FAO, 2016). Além disso, a desaceleração econômica do Brasil influenciou a diminuição de 23% das importações. No entanto, a previsão para a produção aquícola mundial em 2025 é de um aumento de 39%, correspondendo a 102 milhões de toneladas. No Brasil, é previsto um aumento de 104% na oferta de pescado devido aos investimentos realizados no setor, bem como pelo aumento do consumo e das importações (FAO, 2016).

Em relação à produção aquícola continental, a tilápia foi a espécie mais cultivada no Brasil devido a sua adaptação em diferentes condições ambientais, elevada produtividade, alta resistência a baixas concentrações de oxigênio, pouca suscetibilidade a doenças parasitárias, excelente conversão alimentar, como também a mais aceita pelos consumidores no mercado nacional e internacional devido à ausência de espinhas em “Y”, sabor agradável e carne branca com textura firme (BRASIL, 2011; MONTEIRO, 2013).

O aumento na produção de pescado indica maior busca da população por alimentos mais saudáveis para consumo visto que o pescado possui elevado valor nutritivo, apresentando em média 75% de água, cerca de 8,5% de lipídios, 2% de minerais e 20% de proteínas, sendo essa composição nutricional variável conforme a idade e o tamanho dos peixes, a composição da dieta e o manejo alimentar (MONTEIRO, 2013).

3.2. Geração e aproveitamento de resíduos

Os avanços tecnológicos permitiram o crescimento do processo de industrialização do pescado por meio do surgimento de indústrias de beneficiamento visando aprimorar o processo de obtenção de diferentes apresentações do pescado ao mercado consumidor (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Durante as etapas do processo de industrialização do pescado ocorre geração de resíduos, seja na classificação, lavagem, evisceração ou filetagem. Os resíduos resultantes do beneficiamento do pescado são: cabeça, vísceras, nadadeira, cauda, coluna vertebral, barbatana, escamas e restos de carne, podendo representar 2/3 do volume de matéria prima da indústria (FELTES *et al.*, 2010).

Segundo Pessatti (2001) no Brasil, cerca de 50% dos resíduos provenientes do beneficiamento do pescado são descartados durante o processamento dos produtos. Embora atualmente existam diferentes aplicações para esses resíduos, como a produção de farinha de pescado para consumo animal, elaboração de couro, produção de artefatos ou produção de ingredientes para incorporação nos alimentos, o aproveitamento dos resíduos ainda é pequeno, este ainda consiste em um produto de baixa qualidade (FELTES *et al.*, 2010).

Atualmente, os resíduos da industrialização do peixe são quase sempre destinados as graxarias e a incineração. A construção de graxarias é excelente para a transformação dos resíduos em farinha e óleo de peixe, entretanto, requerem alto custo de implantação restringindo assim os pequenos empreendedores. A incineração é uma alternativa para reduzir a quantidade de resíduos, mas pode representar nova fonte de poluição do ar caso não seja instalado filtros e equipamentos especiais que tornam o processo mais caro (LIMA, 2013).

No processo de produção da farinha, a temperatura e a pressão não são suficientes para degradar as escamas por completo, interferindo no valor nutricional do produto. As escamas também não são totalmente degradadas na digestão ácida nem na fermentação para produção de silagem (CHAGURI, 2010).

Muitas vezes as escamas não são aproveitadas na fabricação de co-produtos e acabam sendo acumuladas em tanques sem receber tratamento ou são descartadas de forma

inadequada nas imediações das indústrias de processamento. Na maioria das vezes esses resíduos são encaminhados para aterros sanitários, no entanto, o acúmulo de resíduos de escamas dificulta sua degradação no ambiente e, sob condições anaeróbicas, a degradação da queratina (proteína da escama) gera compostos tóxicos como sulfeto de hidrogênio e amônia (DAROIT, 2011).

3.3. Escamas de peixe

As escamas constituem um resíduo abundante nas indústrias de beneficiamento do pescado, mas são pouco empregadas na elaboração de novos produtos, em virtude do não reconhecimento desse recurso como matéria prima. Tendo em vista que as escamas apresentam rica composição protéica e abundância como resíduo industrial, a criação de alternativas tecnológicas envolvendo esse recurso, caracteriza-se como uma atividade sustentável. Acredita-se, que para cada quilo de peixe produzido aproximadamente 60 gramas são escamas (BASU; BANIK, 2005).

As escamas possuem duas regiões distintas: uma camada externa composta por fibras de colágeno e uma camada interna composta por fibras colágenas tipo I. As escamas também são constituídas de matéria orgânica e inorgânica, sendo a fração orgânica composta principalmente de queratina, proteínas estruturais fibrosas e insolúveis, e a inorgânica de hidroxiapatita, íons sódio, magnésio e carbonatos (CHAGURI, 2010).

A hidroxiapatita presente na parte inorgânica das escamas é um mineral formado por fosfato de cálcio. Esse mineral tem sido estudado como uma alternativa mais viável economicamente, quando comparado a hidroxiapatita sintética, na adsorção de metais pesados e outros poluentes graças a sua capacidade de troca iônica. Já o colágeno é uma proteína rica em glicina e prolina que apresenta uma pequena quantidade de hidroxiprolina (SANTOS *et al.*, 2009).

A degradação da queratina não ocorre com a ação de proteases comuns como a tripsina, a pepsina e a papaína, pois suas cadeias protéicas são compactadas em estruturas de alfa hélice ou folha beta pregueada. Apresentam elevado nível de enovelamento e formam ligações inter e intracadeia como as ligações dissulfeto, pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas, conferindo às queratinas resistência à degradação proteolítica, insolubilidade e estabilidade (DAROIT, 2011).

As escamas também têm sido estudadas quanto ao seu potencial adsorptivo de poluentes como metais pesados, na elaboração de gelatina a partir da extração de colágeno e em aplicações biomédicas (SANTOS *et al.*, 2009; CHAGURI, 2010; MARTINS, 2015).

3.4. Microrganismos queratinolíticos

Embora a queratina seja recalcitrante e resistente à ação proteolítica, essa proteína sofre decomposição na natureza o que evidencia a existência de microrganismos queratinolíticos capazes de degradar e utilizar a queratina como fonte de energia. Os microrganismos queratinolíticos são assim denominados devido à produção de queratinases, ou seja, enzimas capazes de degradar substratos queratinosos de modo mais eficiente do que outras enzimas proteolíticas (OLIVEIRA, 2006).

Os microrganismos queratinolíticos, tanto mesófilos quanto termófilos podem ser encontrados em diferentes ambientes, independentemente de histórico de deposição de materiais queratinosos, em ambientes aeróbicos ou anaeróbicos. Desse modo, a produção de queratinase na natureza parece ser comum, indicando atuação dos microrganismos queratinolíticos na ciclagem dos componentes das moléculas de queratina como carbono, nitrogênio e enxofre. Com isso é possível explorar a diversidade microbiana visando à utilização de queratinases em aplicações biotecnológicas (GIONGO, 2006).

Os microrganismos Gram-positivos se destacam como importantes produtores de queratinases. Entre eles, o gênero *Bacillus* possui maior representação, sendo descrito várias espécies com potencial queratinolítico como *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. pseudofirmus*, *B. halodurans*. Já os microrganismos Gram-negativos que apresentam potencial queratinolítico são menos abundantes que os Gram-positivos, sendo descrito alguns gêneros como *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Serratia* spp., *Paracoccus* spp. *Chryseobacterium* spp. e *Stenotrophomonas* spp. (DAROIT, 2011).

3.5. Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* pertence a família Bacillaceae e compreende um grupo de bactérias Gram-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas, com formato de bastonetes, tamanhos variáveis (0,5 X 1,2 µm até 2,5 x 10 µm), catalase positiva e produtores de endósporos, estrutura importante que garante a sobrevivência da bactéria em períodos de estresse ambiental. Este gênero é representado principalmente pelo *Bacillus cereus*, causador de infecções como gastroenterites, *Bacillus thuringiensis*, utilizado no controle biológico de pragas, *Bacillus anthracis*, causador do antrax e *Bacillus subtilis*, que é de fácil cultivo e não patogênico (MADIGAN *et al.*, 2016).

O gênero *Bacillus* é considerado heterogêneo no que diz respeito as suas características genéticas e fenotípicas (metabolismo de açúcares, tipo respiratório, composição da parede, etc.). Esses microrganismos são geralmente encontrados no solo, seu habitat principal, onde

desempenham papel importante no ciclo do carbono e são considerados ubíquos devido a diversidade fisiológica das formas vegetativas e a resistência dos esporos (GOMES, 2013).

As espécies de *Bacillus* crescem bem em meios definidos contendo qualquer fonte de carbono. Vários microrganismos do gênero *Bacillus* conseguem utilizar fontes complexas de carbono como polissacarídeos, ácidos nucléicos, lipídios e polímeros complexos por meio da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares que clivam esses compostos (MADIGAN *et al.*, 2016).

3.6. Meio de crescimento microbiano

O meio de cultura é um substrato que contém macro e micronutrientes como nitrogênio, carbono, enxofre, fósforo e quaisquer outros fatores orgânicos de crescimento que o microrganismo não é capaz de sintetizar, permitindo o crescimento microbiano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Um meio de cultura pode ser quimicamente definido ou complexo. O meio quimicamente definido é formulado a partir de substâncias químicas puras orgânicas e/ou inorgânicas e a composição exata é conhecida. Já no meio complexo, a composição química exata não é conhecida, como, por exemplo, extratos de plantas ou de animais, tais como peptona, extratos de carne e de levedura. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Alguns microrganismos necessitam de fatores de crescimento como, por exemplo, as vitaminas, pois participam de diversas coenzimas envolvidas em diferentes reações metabólicas. As bactérias Gram-negativas possuem a capacidade de sintetizar todos os seus fatores de crescimento, em contrapartida, as Gram-positivas são mais exigentes em suas necessidades vitamínicas. Além das vitaminas, os minerais, como o sódio, o potássio, o cálcio e o magnésio, também são importantes para o crescimento microbiano visto que atuam em muitas reações enzimáticas. O pH também constitui um importante fator de crescimento pois pode afetar a respiração dos microrganismos através da inativação de enzimas e da inibição do transporte de nutrientes (TORRES, 2005).

3.7. Enzimas microbianas

Enzimas são catalisadores biológicos, ou seja, são proteínas que apresentam atividade catalítica, atuam diminuindo a energia de ativação de uma reação, aumentando assim, a velocidade da reação. Os catalisadores não afetam a energética ou o equilíbrio de uma reação, nem são consumidos ou transformados por ela, afetam apenas sua velocidade. Além disso, as

enzimas são altamente específicas quanto ao tipo de reação ou de substrato (MADIGAN *et al.*, 2016).

Nas indústrias as células microbianas são muito utilizadas como fontes de enzimas, inclusive mais do que as enzimas derivadas de plantas e animais, em virtude do baixo custo de produção, da grande variedade de atividades catalítica, por apresentar qualidade uniforme e por produzir grande quantidade em tempo curto (ZIMMER *et al.*, 2009).

Diversos grupos de enzimas são aplicados em substratos com o intuito de hidrolisar polímeros complexos. Um exemplo disso é a utilização de lipases na degradação de graxa acumulada e depositada nas paredes de tubulações. As celulases, proteases e amilases também são utilizadas na degradação de polímeros (REGINATO; TEIXEIRA, 2009).

O gênero *Bacillus* é comumente descrito como produtor de queratinases como também de collagenases (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009; PRAKASH; JAYALAKSHMI; SREERAMULU, 2010). O *Bacillus licheniformis* produz proteases que são utilizadas nas indústrias de pescados, de couro, derivados lácteos e processados de carne. Em contrapartida, as proteases de *Bacillus subtilis* são usadas nas indústrias de pães e bebidas (REGINATO; TEIXEIRA, 2009).

Uma importante enzima específica das proteases é denominada queratinase devido a sua capacidade de degradação de substratos queratinosos e de proteínas fibrosas. Estas enzimas são comumente aplicadas nas indústrias de cosméticos, de alimentos, têxteis e na medicina e podem ser importantes em processos biotecnológicos de degradação de resíduos, como por exemplo, de escamas, hidrolisando a queratina em aminoácidos e peptídeos (FONSECA, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASU, B; BANIK, A. K. Production of protein rich organic fertilizer from fish scale by a mutant *Aspergillus niger* AB100 - A media optimization study. **Journal of Scientific & Industrial Research**. New Delhi, v. 64, n. 6, p.293-298, 2005.

BENITES, C. I; SOUZA-SOARES, L.A. Farinhas de silagem de resíduo de pescado co-secas com farelo de arroz: uma alternativa viável. **Archivos de Zootecnia**. Cordoba, v. 59, n. 227, p. 447-450, 2010.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, 60 p, 2011.

CHAGURI, M. P. **Utilização de escamas e *Eichhornia crassipes* no tratamento de efluente de curtume de peles de tilápias**. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Centro de Aquicultura da Unesp, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

DAROIT, D. J; CORRÊA, A. P. F; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Barking, v. 63, n. 3, p.358-363, 2009.

DAROIT, D. J. **Potencial queratinolítico e caracterização de uma queratinase extracelular de *Bacillus* sp. P45**. 158 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura: **Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma. 224 p. 2016.

FELTES, M. M. C; CORREIA, J. F. G; BEIRÃO, L. H; BLOCK, J. M; NINOW, J. L; SPILLER, V. R. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. Campina Grande, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FONSECA, C. F. **Otimização da produção de queratinase por *Bacillus amyloliquefaciens***. 71 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GOMES, M. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária**. UFRGS. Porto Alegre, 2013, 49 p.

HUANG, C. Y; KUO, J. M; WU, S. J; TSAI, H. T. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. **Food Chemistry**. London, v. 190, p. 997-1006, 2016.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Conquistas e desafios. **Panorama da Aquicultura**. Rio de Janeiro, v. 25, n. 150, p.10-23, 2015.

LIMA, L. K. F. **Reaproveitamento de resíduos sólidos na cadeia agroindustrial do pescado**. Palmas: Embrapa pesca e aquicultura, 2013.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; BENDER, K. S; BUCKLEY, D. H; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 12 ed., Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.

MARTINS, M. E. O; CLAUDINO, R. L; MORAIS, J. P. S; CASSALES, A. R; ALEXANDRE, L. C; SOUZA, B. W. S; ALCÂNTARA, L. O; SOUSA, J. R; SOUZA FILHO, M. S. M. Obtenção de gelatina a partir de escama de tilápia (*Oreochromis niloticus*): características químicas e físico-químicas. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2015.

MONTEIRO, M. L. G. **Aproveitamento de resíduos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) para elaboração de novos produtos com valor agregado**. 178 f. Tese (Doutorado) - Curso de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

NAGAI, T., IZUMI, M., ISHII, M. Fish scale collagen. Preparation and partial characterization. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 39, n. 3, p.239-244, 2004.

OLIVEIRA, G. M. **Atividade queratinolítica de uma cepa de *Streptomyce ssp* isolada de um abatedouro de aves**. 47 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

OLIVEIRA, M. M; PIMENTA, M. E. S. G; CAMARGO, A. C. S; FIORINI, J. E; PIMENTA, C. J. Silagem de resíduos da filetagem de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), com ácido fórmico - análise Bromatológica, físico-química e microbiológica. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 30, n. 6, p. 1218-1223, 2006.

PESSATTI, M. L. **Aproveitamento dos subprodutos do pescado**. Meta 11. Relatório final de ações prioritárias ao desenvolvimento da pesca e aquicultura no Sul do 161 14 Brasil. Convênio Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Universidade do Vale do Itajaí: MA/SARC, n. 003/2000, 2001.

PRAKASH, P; JAYALAKSHMI, S. K; SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 87, n. 2, p. 625-633, 2010.

REGINATO, E; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 81-86, 2009.

RURAL CENTRO. **Bahia é o 4º maior produtor de tilápia**. 2012. Disponível em: <http://ruralcentro.uol.com.br/noticias/bahia-e-o-4-maior-produtor-de-tilapia-52556>, acessado em: 19/03/2017.

SANTOS, E. B; VIEIRA, E. F. S; CESTARI, A. R; BARRETO, L. S. Caracterização de escamas do peixe piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de Cu(II) de meio aquoso. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 1, p. 134-138, 2009a.

SANTOS, M. C; NUSSIO, L. G; MOURÃO, G. B; SCHMIDT, P; MARI, L. J; RIBEIRO, J. L; QUEIROZ, O. C. M; ZOPOLLATTO, M; SOUSA, D. P; SARTURI, J. O; TOLEDO FILHO, S. G. Nutritive value of sugarcane silage treated with chemical additives. **Scientia Agricola**. Piracicaba, v.66, n.2, p.159-163, 2009b.

SILVA T. F, PENNA A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 71, n. 3, p. 530-9, 2012.

TORRES, R. C. O. **Utilização de água de coco verde (Cocos nucifera L.) na composição de meios para cultura de *Escherichia coli***. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

ZIMMER, K. R; BORRÉ, G. L; TRENTIN, D. S; WOICICKOSKI JÚNIOR, C; FRASSON, A. P; GRAEFF, A. A; GOMES, P; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**. Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p.123-137, 2009.

CAPÍTULO 1

DEGRADAÇÃO DE ESCAMAS DE PEIXE POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* spp.

Artigo a ser submetido à publicação no periódico *Boletim do Instituto de pesca* [(ISSN 0046-9939 (versão impressa), ISSN 1678-2305 (versão on-line)),
São Paulo, Brasil, 2017]

DEGRADAÇÃO DE ESCAMAS DE PEIXE POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *Bacillus* spp.

Jéssica Ferreira MAFRA, Paulo Sérgio Pedroso COSTA JÚNIOR, Thiago Alves Santos de OLIVEIRA, Elizabeth Amélia Alves DUARTE, Norma Suely EVAGELISTA-BARRETO

RESUMO

Entre os resíduos gerados no processamento do peixe estão as escamas, material abundante, de baixo custo e rico em proteínas e fosfato de cálcio. O tratamento das escamas é dificultado devido a rigidez da queratina, sendo necessário buscar alternativas biotecnológicas de aproveitamento do potencial desse resíduo. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de escamas de peixe. Nos ensaios de degradação, foram transferidos 1 mL do inóculo padronizado (10^8 UFC/mL) dos isolados de *Bacillus* (B1, B2, B3 e B4) para *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 60 mL de meio mínimo mineral (suplementado com 1% de glicose e 1% de extrato de levedura), adicionado de 1 g de escamas de peixe. Em seguida, os *Erlenmeyers* foram incubados por seis dias em agitação a 125 rpm e temperatura controlada de 37 °C. Além disso, o pH foi medido antes e após a incubação. O rendimento da degradação usando escamas inteiras por isolados do gênero *Bacillus* variou de 12 a 21%. Já em relação a degradação usando escamas trituradas, o rendimento foi superior, variando de 13 a 26%. Verificou-se também que o maior aumento de pH (7,8) ocorreu com o isolado B1, o qual apresentou maior taxa de degradação da escama. Foi possível concluir que as cepas de *Bacillus* usadas nesse estudo apresentaram capacidade de degradação da escama e que a bioconversão desse material por meio da fermentação é uma alternativa para reduzir a quantidade de resíduos sólidos industriais.

Palavras-chave: Degradação, proteases, pH

ABSTRACT

Among the residues generated in fish processing are scales, abundant material, low cost and rich in protein and calcium phosphate. The treatment of the scales is difficult due to the rigidity of the keratin, being necessary to look for biotechnological alternatives to take advantage of the potential of this residue. Thus, the present study aimed to investigate the biotechnological potential of bacteria of the genus *Bacillus* in the degradation of fish scales. In the degradation assays, 1 mL of the standardized inoculum (10^8 CFU / mL) of the *Bacillus* isolates (B1, B2, B3 and B4) was transferred to the 250 mL Erlenmeyer flask containing 60 mL of minimal mineral medium (supplemented with 1% glucose and 1% yeast extract), added with 1 g of fish scales. Then the Erlenmeyers were incubated for six days under agitation at 125 rpm and temperature controlled at 37°C. In addition, pH was measured before and after incubation. The degradation yield using whole scales by isolates of the genus *Bacillus* ranged from 12 to 21%. In relation to the degradation using crushed scales, the yield was higher, varying from 13 to 26%. It was also verified that the highest pH increase (7.8) occurred with the isolate B1, which presented higher rate of scale degradation. It was possible to conclude that the *Bacillus* strains used in this study showed scale degradability and that the bioconversion of this material through fermentation is an alternative to reduce the amount of industrial solid waste.

Key-words: Degradation, proteases, pH

1. Introdução

O Brasil apresenta grande potencial para a aquicultura em virtude de suas dimensões, extensa costa litorânea, clima tropical em boa parte do território, disponibilidade de recursos hídricos, áreas propícias para a construção de açudes e tanques, e inúmeras espécies para cultivo (KUBITZA, 2015).

A produção aquícola no Brasil atingiu 562,5 mil toneladas em 2014, sendo representada principalmente pela piscicultura continental, apresentando um aumento de 10% em relação as 479,3 mil toneladas produzidas em 2010. Este aumento fez com que o país subisse no *ranking* para a 14° posição entre os principais produtores do mundo, confirmando o potencial do Brasil para a aquicultura (BRASIL, 2011; FAO, 2016).

Com a expansão da aquicultura no Brasil, a quantidade de resíduos gerados pelo setor de beneficiamento também aumenta. Embora o aproveitamento dos resíduos garanta processos mais econômicos e seja importante para a preservação ambiental, essa prática ainda é pouco realizada no Brasil (LIMA, 2013). Dentre os resíduos gerados no processamento de peixe estão as vísceras, escamas, coluna vertebral, pele, cabeça e restos de carne. Estima-se que, a depender da espécie e do tipo de processamento, os resíduos possam representar em torno de 50% da matéria prima (MARTINS *et al.*, 2015). Acredita-se que para cada quilo de peixe, aproximadamente 6% corresponda aos resíduos de escamas (BASU; BANIK, 2005).

As escamas são compostas basicamente por matéria orgânica e inorgânica. Na fração orgânica se encontram as proteínas colágeno e queratina e na parte inorgânica, a hidroxiapatita (fosfato de cálcio). As escamas de peixes marinhos e de peixes dulcícolas, apesar de similares, podem apresentar variações na quantidade e tipos de minerais diferentes da apatita, em virtude das diferenças no ambiente aquático (SANTOS, 2009; BEMVENUTI, 2010).

Atualmente, os resíduos de escamas gerados pela indústria pesqueira são muitas vezes encaminhados as graxarias, para a produção de farinha e óleo de peixe, e a incineração. Entretanto, essas alternativas exigem alto custo de implantação e podem representar nova fonte de poluição do ar, da água e do solo, além de desperdiçarem o valor nutricional da escama. Os resíduos de escamas também são encaminhados à produção de artesanato e compostagem, onde são pouco degradados. No entanto, esses destinos não absorvem toda a quantidade de resíduos gerados (LIMA, 2013).

A dificuldade no tratamento de resíduos de escama é atribuída a rigidez da queratina, proteína fibrosa presente em sua composição. Desse modo, uma alternativa viável, promissora

e sustentável para explorar o potencial protéico da escama de peixe é a bioconversão a partir de processos enzimáticos (MORIMURA *et al.*, 2002).

Existem vários microrganismos queratinolíticos que produzem queratinases para a degradação da queratina, sendo a maioria das bactérias Gram-positivos do gênero *Bacillus*. As queratinases são proteases específicas de origem intra ou extracelular, que se diferenciam de outras proteases por apresentar maior capacidade de degradação em substratos compactados (TORK *et al.*, 2013).

Baseado nisso, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de escamas de peixe.

2. Material e Métodos

2.1 Preparação das escamas in natura

As escamas de tilápia (5 Kg) foram coletadas na Unidade de Beneficiamento de Ituberá, Bahia e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA), onde foram lavadas com sabão e água clorada corrente e posteriormente água destilada. Em seguida, as escamas foram submetidas à secagem por 12 horas em estufa a 60°C e armazenadas em temperatura ambiente.

2.2 Isolamento de *Bacillus* spp.

Foram isolados *Bacillus* sp. de duas amostras: uma amostra de intestino de piranha e uma amostra de resíduos de escamas. Cinco gramas de cada amostra foram adicionadas separadamente em 5 mL de solução salina a 1,5% de cloreto de sódio (NaCl). Em seguida, essas soluções foram mantidas a 80 °C por 1 hora e depois resfriadas. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada em solução salina a 1,5% de NaCl, até a diluição 10^{-3} . Como etapa posterior, placas de Petri contendo ágar nutriente a 1,5% de NaCl foram inoculadas com 20 µL das diluições das amostras e absorvidas no meio com o auxílio de alça de *Drigalsky*. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas. O crescimento de colônias típicas e isoladas do gênero *Bacillus* foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio TSA (*trypticase soy agar*) inclinado e armazenados a 10 °C para posterior utilização (VITTORI *et al.*, 2008). Além desses isolados, outras duas cepas provenientes do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA) e do Laboratório de Biologia Evolutiva (LABEV) também foram usadas nos ensaios de degradação.

2.3 Seleção de bactérias degradadoras de escamas de peixe

Os isolados foram ativados em caldo nutriente 1,5% de NaCl. Em seguida, o crescimento foi testado em meio ágar escama triturada (1g de triptona, 0,5g de extrato de levedura, 1g de NaCl, 5g de escamas e 15g de ágar, pH 6,5). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas. Das colônias que cresceram no meio, cinco foram repicadas para posterior teste da atividade proteolítica (SILVA et al., 2010).

2.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi realizada em duplicata e visualizada por meio da formação de halos em placas de ágar leite (AL) nas temperaturas de 30 °C e 45 °C por 48 horas. Dos isolados que cresceram no meio, cinco foram testados quanto a degradação da escama de peixe (TEBALDI *et al.*, 2008).

2.5 Ensaio de degradação

Os isolados bacterianos que apresentaram atividade proteolítica foram ativados em ágar TSA inclinado e incubados a 37 °C por 24 h. Em seguida, uma alçada da cultura foi ressuspensa em 9 mL de solução salina 0,85% até que a densidade bacteriana lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm se encontrasse no intervalo de 0,08 a 0,10 (10^8 UFC/mL). Após a padronização dos isolados, um inóculo de 1 mL foi transferido para *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 60 mL de meio mínimo mineral (0,05g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,005g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,015g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,025g de $CaCl_2$ e 1000 mL de H_2O , pH 6,2) suplementado com 1% de glicose e 1% de extrato de levedura, adicionado de 1 g de escamas, previamente autoclavado a 121°C por 20 minutos. Em seguida, os *Erlenmeyers* foram incubados por seis dias em agitação a 125 rpm e temperatura controlada de 37 °C. O pH do meio foi ajustado inicialmente (antes da inoculação com o microrganismo) para 6,2 e verificado após 6 dias de degradação. O inóculo padronizado também foi transferido para um controle positivo contendo o meio sem as escamas, com o intuito de verificar o peso da massa microbiana. O controle negativo continha apenas o meio com a escama, sem o microrganismo, para verificar o que foi degradado apenas com o processo de agitação. O ensaio de degradação foi realizado com escamas inteiras e com escamas trituradas. Para a trituração, as escamas foram autoclavadas a 121 °C por 20 minutos e em seguida foram trituradas em moinho de facas tipo Willye. Para verificar se houve contaminação, ao final da fermentação uma alçada do meio de cultura foi plaqueada em *Plate*

Count Agar (PCA). Após este procedimento, o caldo foi filtrado em papel de filtro, previamente seco em estufa a 65 °C, por 24 horas e pesado. Os ensaios de degradação foram realizados em triplicata.

A porcentagem de degradação foi calculada da seguinte maneira (REGINATO; TEIXEIRA, 2009):

$$R = MI - (MF - MM) - (MI - MC)$$

$$R = MI - MF + MM - MI + MC$$

$$R = MM + MC - MF$$

Onde:

R = Degradação do resíduo em porcentagem

MI = Massa inicial da amostra seca

MF = Massa final da amostra seca

MM = Massa microbiana seca (controle positivo)

MC = Massa final da amostra seca do controle negativo

2.6 Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados que degradaram a escama foram identificados, quanto ao gênero, utilizando critérios morfológicos e bioquímicos. As características morfológicas estudadas foram: morfologia e arranjo celular e teste bioquímico de produção de catalase (com H₂O₂ a 3%) (SILVA *et al.*, 2010). Apenas o isolado que apresentou melhor degradação foi identificado com base em critérios moleculares.

O DNA foi extraído utilizando o Kit Wizard[®] SV Genomic DNA Purification System (Promega) seguindo instruções do fabricante. A integridade e a quantidade do DNA foram verificadas usando eletroforese em gel de agarose a 0,8% e Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen), respectivamente.

O gene 16S rRNA foi amplificado por PCR utilizando os *primers* 8fn - 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' e 1492r - 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (WEISBURG *et al.*, 1991) para o domínio Bacteria, utilizados os seguintes reagentes e concentrações: 60 ng de DNA de cada amostra; 1x de tampão da enzima Taq DNA polimerase; 3,7 mM de MgCl₂; 0,6 pmol/μL de dNTPs; 0,4 pmol/μL de cada primer; 5 U de Taq DNA polimerase, com volume final ajustado para 50 μL com água ultra pura. Foram incluídos nos experimentos o controle negativo, substituindo o DNA por água ultra pura. Os ciclos de amplificações foram realizados no Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems) com temperatura inicial de desnaturação 95 °C por 3 minutos; 30 ciclos de

amplificação a 95 °C por 1 minuto; 55 °C por 1 minuto; 72 °C por 2 minutos e temperatura de extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sobre luz ultravioleta. Em seguida, os amplicons foram purificados utilizando o kit Illustra® GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life Sciences) para posterior identificação nucleotídica utilizando o sequenciador automático *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) da empresa ACTGene Análises Moleculares LTDA. A edição e montagem das sequências foram realizadas com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Code Corporation). O programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990) foi usado para comparar as sequências de cada isolado com aquelas depositadas em bancos de dados públicos que foram incluídas nas análises para fins de comparação.

2.7 Análise estatística

As médias foram submetidas à análise de variância (ANOVA), sendo o agrupamento de médias efetuadas pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$), utilizando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011).

3. Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os isolados utilizados na degradação das escamas de tilápia, bem como, sua origem e código utilizado.

Tabela 1. Microrganismos utilizados nos ensaios de degradação usando escamas de tilápia.

Origem do isolado	Código	Microrganismos
Resíduos de escama	B1	<i>Bacillus subtilis</i>
Intestino de peixe	B2	<i>Bacillus</i> sp.
LABMAA ¹	B3	<i>Bacillus cereus</i>
LABEV ²	B4	<i>Bacillus</i> sp.

¹Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental; ²Laboratório de Biologia Evolutiva.

O rendimento da degradação usando escamas inteiras por isolados do gênero *Bacillus* variou de 12 a 21%. Já em relação a degradação usando escamas trituradas, o rendimento foi superior, variando de 13 a 26% (Tabela 2). O isolado que apresentou maior rendimento na

degradação usando escama inteira foi o B4 e na degradação usando escama triturada foi o isolado B1 (Tabela 2).

A taxa de degradação do isolado B1 diferiu estatisticamente usando escama inteira e escama triturada. A taxa de degradação do isolado B2 diferiu estatisticamente das taxas dos demais isolados no ensaio de degradação usando escama triturada (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual médio do rendimento da degradação de escamas de tilápias por bactérias do gênero *Bacillus*.

Isolados	Degradação da escama bruta (%)	Degradação da escama triturada (%)
B1	16aB	26aA
B2	12aA	13bA
B3	15aA	22aA
B4	21aA	22aA
C.V.%	0,23	2,31

*Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). **Os dados experimentais foram ajustados em $\cos x^{-1}$.

Os resultados das médias de pH encontradas no meio usado na degradação das escamas de tilápia após seis dias de degradação são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Variação da média de pH durante a degradação de escama de tilápia por isolados bacterianos no final da degradação.

	Ensaio com escama bruta	Ensaio com escama triturada
Isolados	pH final	pH final
B1	7,6cA	7,8cA
B2	5,8bA	5,8bA
B3	4,6aA	4,6aA
B4	4,6aA	6,1bB
C.V.%	1,84	2,61

*Valores seguidos pela mesma letra minúscula em cada coluna e mesma letra maiúscula em uma linha, não diferem estatisticamente, segundo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Observou-se que a variação de pH foi igual para os isolados B2 e B3 em relação aos ensaios de degradação com escama bruta e escama triturada. Verificou-se também que o

maior aumento de pH ocorreu com o isolado B1, o qual apresentou maior taxa de degradação da escama triturada (Tabela 2 e 3).

O isolado B1, que apresentou melhor taxa de degradação da escama triturada, foi identificado em análise molecular como *Bacillus subtilis* (Tabela 4). O isolado B4 também se destacou na degradação da escama triturada, especialmente na degradação da escama bruta. Embora o pH do meio onde o isolado B4 estava, tenha diminuído nos dois ensaios, o isolado B4 apresentou a melhor taxa de degradação da escama bruta.

Tabela 4. Identificação molecular de *Bacillus subtilis* proveniente de resíduos de escama.

Isolado	Tamanho (pb)	Cobertura (%)	Identidade ²	Taxonomia	Nº de acesso ³
B1	549	100	98%	<i>Bacillus subtilis</i>	KU500023.1; KJ812207.1; CP010052.1; JF749278.1; AL009126.1

¹Os *amplicons* foram sequenciados em ambas as orientações (F- forward) e (R- reverse) e os fragmentos de consulta apresentados correspondem à sequência obtida *contig*. ²e-values "iguais a zero para todos os isolados.

³Os números de acesso correspondem às sequências descritivas da taxonomia indicada na coluna anterior.

4. Discussão

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Bacillus* estão presentes em diversos ambientes e cada espécie apresenta características físico-químicas únicas. Essa adaptação foi conquistada, em parte, por meio do arsenal enzimático que proporcionou capacidade de degradação de diferentes tipos de substratos (MELO *et al.*, 2016). Esse conteúdo enzimático tornou o gênero *Bacillus* alvo de vários estudos para aplicação biotecnológica (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009; PANT *et al.*, 2015; FERRAREZE; CORRÊA; BRANDELLI, 2016).

O melhor rendimento na degradação de escamas trituradas pela cepa de *Bacillus subtilis*, isolada de escamas de peixe, pode ter ocorrido pelo fato de que o metabolismo do microrganismo já se encontrava adaptado às condições do substrato e pela maior facilidade de hidrolisar substratos previamente triturados. A biodegradação observada também pode ser explicada pela produção de enzimas extracelulares, como colagenases, queratinases e outras proteases, que hidrolisam ligações peptídicas do substrato e o utilizam como fonte de carbono (Tabela 2) (PRAKASH; JAYALAKSHMI; SREERAMULU, 2010).

Daroit, Corrêa e Brandelli (2009) observaram que durante o crescimento de *Bacillus* sp. P45 em caldo de penas ocorreu a produção de protease extracelular e queratinase, atingindo atividades máximas aos dois dias de cultivo e posteriormente diminuindo. Esses resultados indicam a capacidade do gênero *Bacillus* de produzir enzimas voltadas a degradação da queratina.

Em células jovens as enzimas podem estar ligadas a membrana e apenas são liberadas para o meio circundante como exoenzimas quando a cultura entra em fase estacionária. Gupta *et al.* (2002), por sua vez relataram que a máxima produção de proteases ocorria na fase estacionária em virtude do estresse nutricional.

Em linhagens de *Bacillus*, o tempo médio necessário para que o microrganismo cresça e produza queratinases geralmente varia entre 24 e 168 h (MOUSAVI *et al.*, 2013; TORR *et al.*, 2013). O tempo de cultivo varia a depender do tipo de substrato queratinoso e de sua concentração (BALAJI *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008). Para Gupta *et al.* (2002), uma opção que pode elevar a produção enzimática seria prolongar o período de incubação durante a fase estacionária.

A adição de suplementos nutricionais como a glicose e o extrato de levedura pode induzir a repressão catabólica (MADIGAN *et al.*, 2016). No entanto, para Adiguzel *et al.* (2009) a utilização de suplementos é opcional e depende do metabolismo de cada microrganismo, podendo estimular ou inibir a secreção de proteases.

Um parâmetro que influencia fortemente a produção de enzimas a partir de microrganismos é o pH. O pH do meio contendo os isolados B2, B3 pode ter diminuído em decorrência da produção de metabólitos, o que pode ter reduzido ou inibido a atividade enzimática e conseqüentemente a degradação da escama de peixe (MADIGAN *et al.*, 2016). Embora o pH do meio contendo o isolado B4 tenha diminuído, não foi observado diminuição na taxa de degradação. Isso pode ter ocorrido devido ao fato dessa linhagem, em especial, apresentar melhor atividade enzimática em pH baixo.

Ferrareze, Corrêa e Brandelli (2016) observaram que a queratinase de *B. subtilis* obteve elevada atividade enzimática nas faixas de pH neutro e alcalino, enquanto em condições ácidas foi verificado perda total da atividade enzimática. Balaji *et al.* (2008) verificaram que a queratinase produzida por *Bacillus subtilis* apresentava atividade entre pH 5,0 e 7,0, pH ótimo de 6,0 e diminuía a sua atividade em 39% quando o pH se encontrava em 3,0 e em 53% em pH 9,0.

Lima *et al.* (2014), verificaram atividade colagenolítica produzida por *B. stearothermophilus* numa faixa de pH de 5,0 a 10,0, sendo que a atividade máxima da enzima foi com pH 9,0, demonstrando que esse é o pH ótimo da enzima.

A hidrólise da queratina é acompanhada pelo aumento do pH do meio de cultivo. De fato, quanto maior é a capacidade queratinolítica dos microrganismos, mais alcalino se torna o meio de cultura (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2009). A tendência de aumento do pH no meio de cultivo é resultado da produção de amoníaco por meio da desaminação de aminoácidos e péptidos oriundos da degradação da queratina. Microrganismos que crescem em substratos de proteína normalmente causam aumento de pH no meio de cultivo (KUMAR *et al.*, 2008).

Muitos estudos vêm relatando processos de degradação, principalmente em referência a substratos queratinosos como cabelo, pena e farinha de pena e caracterização de enzimas (MANCZINGER *et al.*, 2003; RIFFEL; BRANDELLI, 2006), demonstrando a necessidade cada vez maior de desenvolvimento de processos que garantam o total aproveitamento de resíduos visando reduzir custos e diminuir o impacto ambiental.

5. Conclusões

As linhagens de *Bacillus* apresentaram capacidade de degradação de substratos recalcitrantes a base de escama e a bioconversão desse material por meio da fermentação é uma alternativa para reduzir a quantidade de resíduos sólidos industriais.

6. Referências bibliográficas

ADIGUZEL, A. C; BITLISLI, B. O; YAŞA, I; ERIKSEN, N. T. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 107, n. 1, p. 226–234, 2009.

ALTSCHUL, S. F; GISH, W; MILLER, W; MYERS, E. W; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. London, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

BALAJI, S; SENTHIL KUMAR, M; KARTHIKEYAN, R; KUMAR, R; KIRUBANANDAN, S; SRIDHAR, R; SEHGAL, P. K. Purification and characterization of na extracullular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Oxford, v. 24, n. 11, p. 2741-2745, 2008.

BASU, B; BANIK, A. K. Production of protein rich organic fertilizer from fish scale by a mutant *Aspergillus niger* AB100__ A media optimization study. **Journal of Scientific & Industrial Research**. New Delhi, v. 64, n. 6, p.293-298, 2005.

BEMVENUTI, M. A.; FISCHER, L. G. Peixes: Morfologia e adaptações. **Cadernos de Ecologia Aquática**. Rio Grande, v. 5, n. 2, p. 31-54, 2010.

BRASIL, Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília, 60 p. 2011.

CHOI J-M, HAN S-S, KIM H-S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**. Nova York, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, 2015.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Barking, v. 63, n. 3, p.358-363, 2009.

FAO. El estado mundial de la pesca y la acuicultura: **Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma. 224 p. 2016.

FERRAREZE, P. A. G; CORREA, A. P. F; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**. v. 7, p.102-109, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GUNDERSON, A. R; FRAME, A. M; SWADDLE, J. P; FORSYTH, M. H. Resistance of melanized feathers to bacterial degradation: Is it really so black and white? **Journal of Avian Biology**. Copenhagen, v. 39, n.5, p. 539-545, 2008.

GUPTA, R; BEG, Q. K; KHAN, S; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 60, n.4, p. 381-395, 2002.

GUPTA, R; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology And Biotechnology**. Berlin, v. 70, n. 1, p. 21-33, 2006.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Conquistas e desafios. **Panorama da Aquicultura**. Rio de Janeiro, v. 25, n. 150, p.10-23, 2015.

KUMAR, A. G; SWARNALATHA, S; GAYATHRI, S; NAGESH, N; SEKARAN, G. Characterization of an alkaline active–thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 104, n. 2, p. 411-419, 2008.

LIMA, L. A; CRUZ FILHO, R. F; SANTOS, J. G; SILVA, W. C. Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. **Acta Amazonica**. Manaus, v. 44, n. 4, 2014.

- LIMA, L. K. F. **Reaproveitamento de resíduos sólidos na cadeia agroindustrial do pescado**. Palmas: Embrapa pesca e aquicultura, 2013.
- MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; BENDER, K. S; BUCKLEY, D. H; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 12 ed., Porto Alegre: Artmed, 1006 p. 2016.
- MANCZINGER, L; ROZS, M; VÁGVOLGYI, C; KEVEI, F. Isolation and characterization of a new keratinolytic *Bacillus licheniformis* strain. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Oxford, v. 19, n. 1, p. 35–39, 2003.
- MARTINS, M. E. O; CLAUDINO, R. L; MORAIS, J. P. S; CASSALES, A. R; ALEXANDRE, L. C; SOUZA, B. W. S; ALCÂNTARA, L. O; SOUSA, J. R; SOUZA FILHO, M. S. M. Obtenção de gelatina a partir de escama de tilápia (*Oreochromis niloticus*): características químicas e físico-químicas. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical-**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2015.
- MELO, L. F. A; LOCATELLI, G. O; LUNA-FINKLER, C. L; SOUZA, I. A. **Perfil Enzimático de Bacillus sp. Isolados de Ambiente Marinho**. Em: XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática-ENZITEC, Recife, PE, f. 4, 2016.
- MORIMURA, S; NAGATA, H; UEMURA, Y; FAHMI, A; SHIGEMATSU, T; KIDA, K. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**. London, v. 37, n. 12, p. 1403-1412, 2002.
- MOUSAVI, S; SALOUTI, M; SHAPOURY, R; HEIDARI, Z. Optimization of keratinase production for feather degradation by *Bacillus subtilis*. **Jundishapur Journal of Microbiology**. Ahvaz, v. 6, n. 8, p. 6-10, 2013.
- PANT, G; PRAKASH, A; PAVANI, J. V. P; BERA, S; DEVIRAM, G. V. N. S; KUMAR, A; PANCHPURI, M; PRASUNA, R. G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University For Science**. Medina, v. 9, n. 1, p. 50-55, 2015.
- PRAKASH, P; JAYALAKSHMI, S. K; SREERAMULU, K. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 87, n. 2, p. 625-633, 2010.
- REGINATO, E; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 81-86, 2009.
- RIFFEL, A; BRANDELLI, A. Bactérias queratinolíticas isoladas de resíduos de penas. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v. 37, n. 3, p. 395-399, 2006.
- SANTOS, E. B; VIEIRA, E. F. S; CESTARI, A. R; BARRETO, L. S. Caracterização de escamas do peixe piau (*Leporinus elongatus*) e sua aplicação na remoção de Cu(II) de meio aquoso. **Química Nova**. São Paulo, v. 32, n. 1, p. 134-138, 2009.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A; SILVEIRA, N. F. A; TANIWAKI, M. H; SANTOS, R. F. S; GOMES, R. A. R; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2010.

TEBALDI, V. M. R; OLIVEIRA, T. L. C; BOARI, C. A; PICCOLI, R. H. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 28, n. 3, p.753-760, 2008.

TORK, S. E; SHAHEIN, Y. E; EL-HAKIM, A. E; ABDEL-ATV, A. M; ALY, M. M. Production and characterization of thermostable metallo-keratinase from newly isolated *Bacillus subtilis* NRC 3. **International Journal of Biological Macromolecules**. Guildford, v. 55, p. 169-175, 2013.

VITTORI, J; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P; POIATTI, M. L; PIGATTO, C. P; CHIODA, T. P; RIBEIRO, C. A. M; GARCIA, G. R; RAGAZANI, A. V. F. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 38, n. 3, p.761-765, 2008.

WEISBURG, W. G; BARNS, S. M; PELLETIER, D. A; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 173, p. 697-703, 1991.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MEIOS FORMULADOS A PARTIR DE ESCAMAS DE PEIXE POR MEIO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis*

Artigo a ser submetido à publicação no periódico *nome do periódico* (ISSN número ISSN),
cidade do periódico, país, ano]

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MEIOS FORMULADOS A PARTIR DE ESCAMAS DE PEIXE MEIO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Bacillus subtilis*

Jéssica Ferreira MAFRA, Thiago Alves Santos de OLIVEIRA, Norma Suely EVAGELISTA-BARRETO

RESUMO

O aumento do número de indústrias voltadas para o beneficiamento do pescado tem gerado grandes quantidades de resíduos potencialmente poluidores. As escamas de peixe se destacam como um material rico em proteínas, de baixo custo e disponível em grandes quantidades. O gênero *Bacillus* apresenta a capacidade de produzir diferentes enzimas em virtude de sua ampla variedade metabólica. Nesse sentido, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de diferentes formulações de meio de cultura a base de escama de peixe para o crescimento de *Bacillus subtilis*. Foram formulados dois meios de cultivo a base de escamas, caldo C1 (5g de escamas trituradas, 5g de glicose, 1,5g de extrato de levedura, 5g de cloreto de sódio e 1000 mL de água destilada) e caldo C2 (hidrolisado de escamas proveniente da etapa de degradação). A eficiência dos meios formulados foi apresentada por meio da velocidade específica de crescimento μ (h^{-1}) e do tempo de duplicação, t_d (h) de *Bacillus subtilis*. No caldo escama de peixe (caldo C1), o crescimento de *B. subtilis* apresentou maior velocidade específica de crescimento ($0,839 \text{ h}^{-1}$), diferindo estatisticamente dos demais caldos, e menor tempo de duplicação (49,57 min), no entanto, o crescimento em caldo hidrolisado proteico de escama de peixe (caldo C2) apresentou as fases de crescimento mais definidas e uma transição da fase exponencial para a fase estacionária mais gradual. Concluiu-se que é possível o aproveitamento de escama de peixe na formulação de meios de cultura em substituição aos meios comerciais disponíveis hoje no mercado.

Palavras-chave: carbono, crescimento exponencial, meio de cultura.

ABSTRACT

The increase in the number of industries involved in processing fish has generated large amounts of potentially polluting waste. Fish scales stand out as a low-cost, protein-rich material available in large quantities. The *Bacillus* genus has the ability to produce different enzymes because of its wide metabolic variety. In this sense, the present study had as objective to evaluate the efficiency of different formulations of culture medium based on fish scale for the growth of *Bacillus subtilis*. Two culture media were formulated based on flakes, C1 broth (5 g of crushed flakes, 5 g of glucose, 1.5 g of yeast extract, 5 g of sodium chloride and 1000 ml of distilled water) and C2 broth (hydrolysed flakes From the degradation step). The efficiency of the formulated media was presented by the specific growth rate μ (h^{-1}) and the generation time, t_g (h) of *Bacillus subtilis*. In the fish stock broth (broth C1), the growth of *B. subtilis* presented a higher specific growth rate (0.839 h^{-1}), differing statistically from the other broths, and lower generation time (49.57 min), however, The growth in hydrolyzed fish scale protein broth (C2 broth) presented the most defined growth phases and a transition from the exponential phase to the more gradual stationary phase. It is concluded that it is possible to use fish scale in the formulation of culture media in replacement of the commercial means available on the market today.

Key-words: Carbon, exponential growth, culture medium.

1. Introdução

Nos últimos anos, o Brasil vem ganhando destaque na produção de pescado, atingindo a posição de 14º no *ranking* entre os principais produtores mundiais no ano de 2014. Além disso, estima-se que em 2025, o cenário nacional alcançará patamares de desenvolvimento ainda maiores, cobrindo a crescente demanda de produtos pesqueiros com um aumento considerável de 104% na produção aquícola (FAO, 2016).

O crescente número de indústrias de beneficiamento de produtos da piscicultura, visando atender um mercado mais exigente quanto a praticidade, diversidade e qualidade do pescado, como também o aumento no consumo de diferentes espécies de peixes, tem resultado na geração de grandes quantidades de resíduos sólidos, representando 50 a 70% da matéria prima original. Muitas vezes esses resíduos são pouco aproveitados e descartados de forma incorreta no ambiente, promovendo a poluição do ar, do solo e da água (PATI; ADHIKARI; DHARA, 2010).

A produção de tilápia no Brasil em 2010 chegou a 155 mil toneladas e foi responsável por 32% da produção aquícola brasileira total (FAO, 2012). A tilápia é um peixe de grande importância econômica na cadeia produtiva brasileira devido ao sabor agradável, carne branca com textura firme, boa adaptação a diferentes ambientes e elevada produtividade (SCORVO FILHO, 2006). Estima-se que a tilápia será uma das espécies responsável pela maior parte do aumento da produção aquícola e representará juntamente com a carpa e o peixe gato, cerca de 60% da produção aquícola mundial em 2025 (FAO, 2016).

As escamas de tilápia são estruturas ósseas ou de queratina, cicloides, subcirculares, finas e com margem lisa. Em relação a sua composição química, elas são compostas por uma fase inorgânica de apatita e uma fase orgânica principalmente de colágeno e queratina (MARTINS *et al.*, 2015).

Segundo Basu e Banik (2005) nas indústrias de beneficiamento de produtos pesqueiros são gerados cerca de 60 g de resíduos de escamas para cada quilo de peixe. O descarte de escamas é um problema ambiental, entretanto, por possuir alto teor de proteínas e minerais e por ser de fácil obtenção, pode ser utilizado na formulação de meio de cultura como alternativa para aproveitar esses resíduos e aumentar os retornos econômicos para a indústria pesqueira. Portanto, caracteriza-se como uma solução promissora a utilização desses resíduos na otimização da obtenção de produtos de valor agregado (HUANG *et al.*, 2016).

As enzimas produzidas por células microbianas são muito utilizadas em indústrias de alimentos em razão da necessidade de hidrólise de polímeros complexos visando a

degradação microbiológica de substratos, como por exemplo, as proteases, amilases, lipases e celulases (REGINATO; TEIXEIRA, 2009).

O gênero *Bacillus* apresenta ampla variedade metabólica o que garante a produção de diferentes enzimas e, conseqüentemente, a capacidade de degradação de diferentes substratos (PARRADO *et al.*, 2014). *Bacillus subtilis* é uma espécie GRAS (*generally recognized as safe*) que produz e secreta várias proteínas e apresenta alta taxa de crescimento. Além disso, esse microrganismo é considerado modelo entre os Gram-positivos no que diz respeito a expressão de enzimas como proteases e lipases. Acredita-se que esse gênero produza cerca de 60% das enzimas que são comercializadas (WESTERS; WESTERS; QUAX, 2004).

Diferentes meios de cultura são comumente utilizados em laboratório de pesquisa e/ou clínico para suprir as necessidades nutricionais das células microbianas, entretanto, os gastos com meio de cultura podem onerar demasiadamente as atividades laboratoriais (MADIGAN *et al.*, 2016). Nesse sentido, observa-se a necessidade de formulações mais baratas, por meio do aproveitamento de resíduos, de modo a alcançar uma relação favorável entre custo, benefício e preservação ambiental.

Com base nisso, o presente trabalho objetivou estudar diferentes formulações de meio de cultura a base de escama de peixe em substituição a formulação de meios de culturas comerciais para o crescimento de *Bacillus subtilis*.

2. Material e métodos

2.1 Obtenção das escamas de peixe

As escamas de tilápia (5 Kg) foram obtidas da unidade de beneficiamento de pescado em Ituberá, Bahia e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA), onde foram lavadas com sabão, água clorada corrente e água destilada. Posteriormente, as escamas foram submetidas à secagem por 12 horas em estufa a 80°C e armazenadas em temperatura ambiente.

2.2 Microrganismo

Para os ensaios experimentais foi usada a bactéria Gram positiva *Bacillus subtilis* B1, pertencente ao acervo de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Alimentos – LABMAA. Para os ensaios, a bactéria foi crescida *overnight* em agar TSA (*Tryptic Soy Agar*) inclinado e incubados a 37°C por 24h. Em seguida, uma alçada da cultura foi ressuspensa em 9 mL de solução salina 0,85% até que a densidade bacteriana lida em

espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm se encontrasse no intervalo de 0,08 a 0,10 (10^8 UFC/mL). Por fim, 1 mL do inóculo padronizado foi transferido para os meios formulados.

2.3 Formulação dos meios de cultura

Foram formulados dois caldos:

Caldo C1: 5g de escamas trituradas, 5g de glicose, 1,5g de extrato de levedura, 5g de cloreto de sódio e 1000 mL de água destilada.

Caldo C2: hidrolisado de escamas proveniente da degradação previa de 1g de escamas trituradas por *Bacillus subtilis* B1.

O caldo C1 foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, enquanto o caldo C2 foi esterilizado por filtração. A composição do caldo escama foi baseada na composição do meio comercial (caldo nutriente) visando a substituição da peptona animal pela escama de peixe.

2.4 Condições de cultivo

2.4.1 Meio de cultura comercial

Inicialmente foi feita a curva de crescimento do microrganismo em meio comercial. Em um frasco *Erlenmeyer* de 500 mL foi adicionado 180 mL de caldo nutriente (0,5% de peptona, 0,5% de cloreto de sódio, 0,15% de extrato de carne e 0,15% de extrato de levedura), inoculado 1 mL do microrganismo padronizado (10^8 UFC/mL) e incubado em estufa a $35^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ a 125 rpm. Nos intervalos de 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 horas, um inóculo de 100 μL foi diluído até 10^{-5} em *eppendorfs* contendo 900 microlitros de solução salina a 0,85% de NaCl. Em seguida, 20 microlitros de cada diluição foi inoculada, em triplicata, em placas contendo o meio PCA (*Plate Count Agar*) e incubadas em estufa a $35^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}/24-48$ horas, para contagem do número de células viáveis, expressos em UFC/mL (Silva *et al.*, 2010).

Contaminação do inóculo foi verificada pelo esgotamento de uma alçada do cultivo no meio específico agar nutriente a 1,5% de NaCl, ao final do ensaio.

2.4.2. Meio de cultura formulado

O experimento foi conduzido em frasco *Erlenmeyer* de 250 mL (para cada caldo), contendo 180 mL do meio de cultura formulado (item 2.3) e incubados em estufa a $35^\circ\text{C} \pm$

0,5°C. A curva de crescimento foi elaborada nos intervalos 0, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48 horas, semelhante ao observado para o meio de cultura comercial (item 2.4.1).

Contaminação do inóculo foi verificada pelo esgotamento de uma alçada do cultivo no meio específico, agar nutriente a 1,5% de NaCl, ao final do ensaio.

2.5 Eficiência dos meios de cultura

A cinética de crescimento do microrganismo (*Bacillus subtilis*) foi utilizada para verificar a eficiência dos meios de cultura experimentais (caldos C1 e C2) em relação ao meio controle (caldo nutriente). Foram calculadas a velocidade específica de crescimento, μ (h^{-1}) e o tempo de duplicação, t_d (h) dos microrganismos a partir das curvas de crescimento do número de células viáveis (UFC/mL) versus tempo (h). Para permitir o ajuste ao modelo de regressão, os valores de UFC/mL foram linearizados por transformação para logaritmo natural (\ln UFC/mL). A velocidade específica de crescimento (μ) corresponde ao coeficiente angular (b) da equação linear do logaritmo natural de UFC/mL em função do período de crescimento, t (h), relacionado à fase exponencial do crescimento e determinado por regressão linear. O valor da velocidade específica de crescimento está relacionado ao tempo de geração pela equação: $t_d = \ln 2/\mu$ (Torres, 2005).

2.6 Análise estatística

A análise dos resultados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SISVAR 5.6 e o teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$) (FERREIRA, 2011).

3. Resultados

A utilização de escamas de peixe na formulação de um meio de cultura é possível, visto a eficiência no desenvolvimento microbiano de *Bacillus subtilis* quando comparado ao meio de cultura comercial (caldo nutriente). O crescimento celular de 10^6 UFC/mL foi alcançada para ambos os meios de cultura formulados, embora em intervalos distintos, superando o crescimento em caldo nutriente (Tabela 1).

Tabela 1. Crescimento de *Bacillus subtilis* utilizando diferentes meios a base de escama de peixe e caldo nutriente.

Tratamentos	Crescimento celular UFC/mL
Caldo C1	22,5 x 10 ⁶ b
Caldo C2	22,5 x 10 ⁶ b
Caldo nutriente comercial	53,0 x 10 ⁵ a
C.V. %	3,1

* Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A Figura 1 mostra as curvas de crescimento obtidas para o cultivo de *Bacillus subtilis* nos três meios de cultura testados (caldo C1, caldo C2 e caldo nutriente).

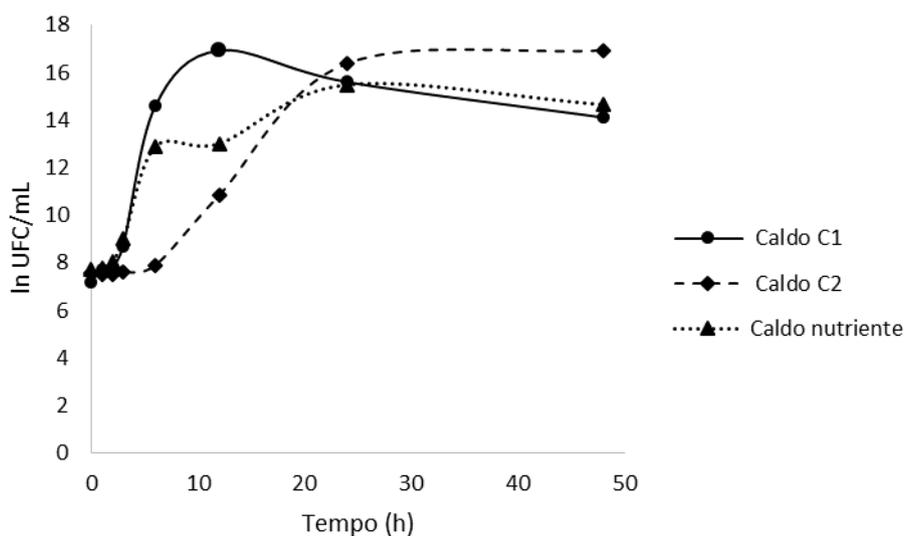


Figura 1. Curvas de crescimento referentes ao cultivo de *Bacillus subtilis* em caldo escama de peixe (C1), caldo hidrolisado proteico de escama de peixe (C2) e caldo nutriente comercial.

No caldo 1 (escama) o final da fase exponencial ocorreu com 12 horas, sendo o mais rápido crescimento dentre os caldos analisados. A linha de tendência mais adequada para representar a curva de crescimento foi a polinomial com coeficiente de regressão (R^2) significativo a 5% de probabilidade. A duração da fase exponencial de *Bacillus subtilis* no caldo C1 foi de 3 a 12 horas, ou seja, a fase mais curta entre os meios testados, com uma velocidade específica de crescimento de $0,839 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração de 49,56 min. Também foi observado uma fase lag de apenas 2 horas (Figura 2).

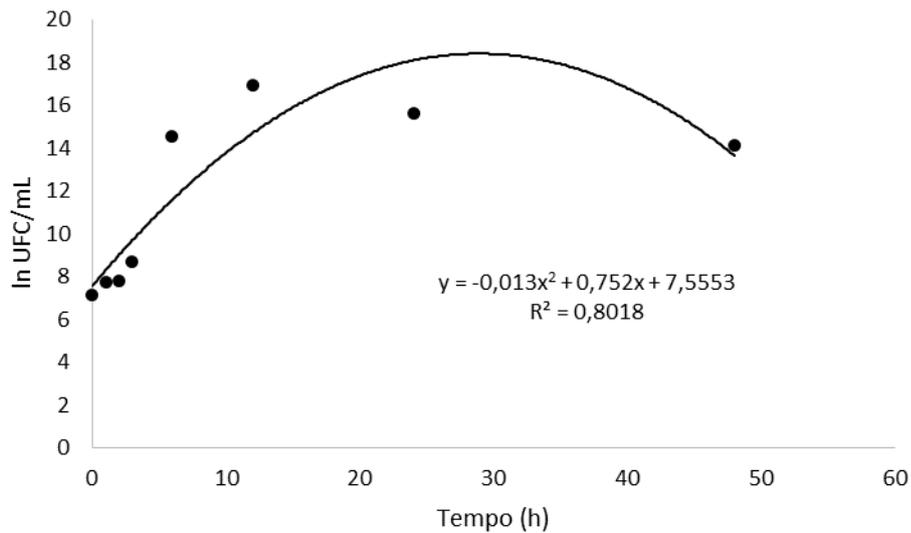


Figura 2. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* no caldo C1.

A curva de crescimento de *B. subtilis* usando o hidrolisado de escama de peixe (caldo 2) mostrou que o pico de crescimento microbiano ocorreu com 24 h de cultivo. O modelo polinomial também foi o mais adequado para representar a curva de crescimento de *B. subtilis* (Figura 3).

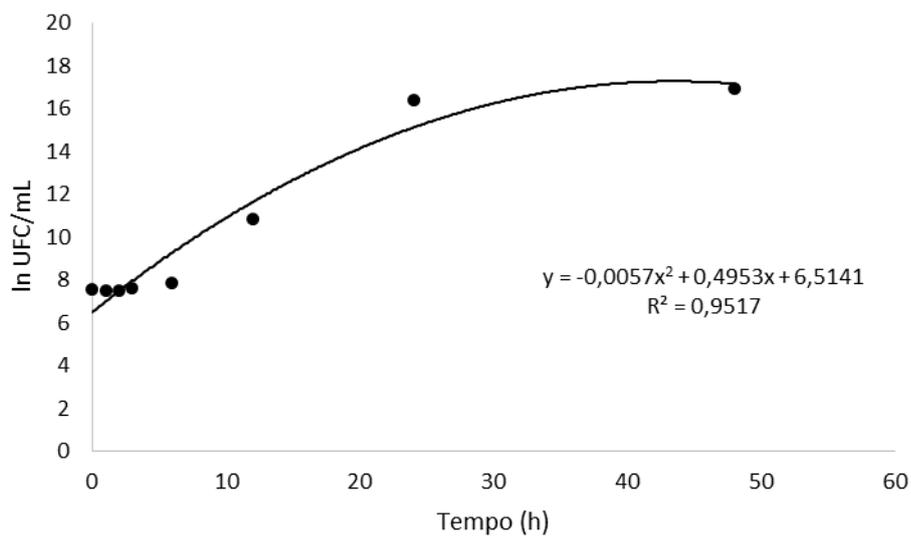


Figura 3. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultura usando hidrolisado protéico de escamas de peixe (caldo C2).

Na Figura 3, a cultura permaneceu em fase exponencial durante 18 horas, intervalo de tempo (6 h a 24 h) utilizado para estimar a equação de regressão linear e consequentemente a

velocidade específica de crescimento e o tempo de geração. A equação de regressão linear foi expressa da seguinte forma: $y = 0,4708x + 5,1065$ com valor de R^2 equivalente a 0,9998.

No caldo 2 (hidrolisado), a velocidade específica de crescimento da cultura correspondeu a $0,4708 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de geração a 1,47 h ou 88,31 min. O valor de R^2 indica que o ajuste da regressão linear explica 99,98% da variação total de y , deixando apenas 0,04% para variação residual (erro), o que significa um bom ajuste. Além disso, foi observado uma fase lag de 3 horas na curva de crescimento de *B. subtilis*.

No caldo nutriente (controle) a fase exponencial durou 21 horas, com uma velocidade específica de crescimento de $0,2527 \text{ h}^{-1}$ e tempo de duplicação de 2,74 horas (Figura 4). O valor de R^2 da regressão linear, obtido para medir a precisão do ajuste da regressão é denominado de coeficiente de determinação e foi equivalente a 0,764 no caldo nutriente. O coeficiente de determinação da regressão linear encontrado no cultivo usando caldo nutriente foi baixo, indicando uma variação residual de 23,6%.

Na Figura 4 é possível observar a presença de duas fases lag, a primeira no intervalo de 2 horas e a segunda de 6 horas.

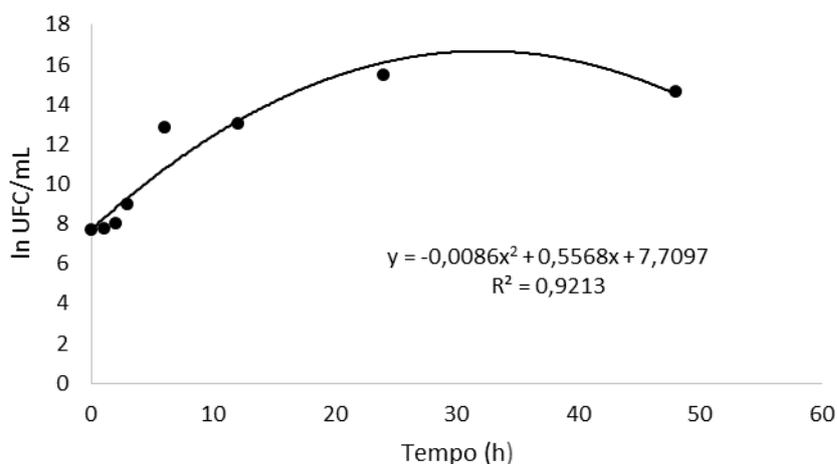


Figura 4. Curva de crescimento de *Bacillus subtilis* em meio de cultura comercial, caldo nutriente.

A Tabela 2 resume os resultados encontrados para a velocidade específica de crescimento, sua análise de variância, o tempo de geração e a duração da fase exponencial em cada um dos meios testados, associados ao crescimento microbiano de *Bacillus subtilis*.

Tabela 2. Velocidade específica de crescimento (μ), tempo de geração (td) e duração da fase exponencial da cultura de *Bacillus subtilis* em três meios de cultura diferentes.

Caldo	μ (h^{-1})	t_d (min)	Duração da Fase log (h)	Duração da Fase lag (h)
C1	0,839 a	49,57	9	2
C2	0,4708 b	88,33	18	3
Caldo nutriente	0,2527 c	164,54	21	2

* Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Verificou-se diferença estatística entre as velocidades específicas de crescimento encontradas, sendo o maior valor associado ao caldo C1 seguido do caldo C2 e do caldo nutriente (Tabela 2).

No hidrolisado proteico (caldo C2) a duração da fase exponencial de crescimento foi mais longa, 18 horas, e a velocidade específica foi menor quando comparado ao caldo escama de peixe (caldo C1).

4. Discussão

Os microrganismos cultivados em laboratório necessitam ser supridos com todos os nutrientes exigidos para o seu crescimento. A exigência nutricional de cada microrganismo é bastante distinta, podendo variar entre os complementos nutricionais e sua quantidade, macronutrientes, exigidos em grandes quantidades e micronutrientes exigidos em poucas quantidades. No entanto, o carbono e o nitrogênio são macronutrientes importantes para todas as células microbianas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O carbono é requerido por qualquer célula microbiana e representa cerca de 50% do peso seco de uma célula, obtido a partir de açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, bases nitrogenadas, ácidos graxos, compostos aromáticos e inúmeros outros compostos orgânicos. Já o nitrogênio representa cerca de 13% do peso seco de uma célula bacteriana, estando presente em ácidos nucleicos, proteínas e inúmeros outros compostos celulares (MADIGAN *et al.*, 2016).

No caldo C2, a duração da fase exponencial de crescimento foi mais longa quando comparado ao caldo C1. No entanto, o caldo C2 apresentou uma curva característica de crescimento bacteriano com as fases bem definidas.

No crescimento de *Bacillus subtilis* em caldo escama de peixe (caldo C1) ocorreu uma brusca diminuição na velocidade instantânea de crescimento após a fase exponencial, na transição para a fase estacionária. Isso provavelmente pode ter ocorrido devido ao esgotamento da glicose. Esse perfil de crescimento não foi observado no caldo hidrolisado

proteico (caldo C2), onde a transição para a fase estacionária foi gradual. A variação encontrada no perfil de crescimento dos caldos C1 e C2 deve estar relacionada a composição dos meios. No hidrolisado proteico (caldo C2) a fonte de carbono e energia era, basicamente, compostos hidrolisados da queratina e do colágeno e no caldo escama de peixe (caldo C1) além de 0,5% de glicose, 0,15% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl, estavam disponíveis 0,5% de escamas trituradas.

Acredita-se que a fase lag mais curta observada tanto no caldo C1 como no caldo nutriente pode ter ocorrido devido a maior disponibilidade de nutrientes. Segundo Tortora, Funke e Case (2012) a fase lag é o período de preparação para a proliferação, podendo ser curta ou levar várias horas a depender da composição do meio original, composição do novo meio, tipo e idade da estirpe, genética do microrganismo, quantidade de microrganismos, fatores físicos como pH, agitação, temperatura e até mesmo a presença de substâncias produzidas durante o metabolismo do microrganismo, como ácidos orgânicos.

De acordo com Sikyta (1995), quanto mais rico o meio, menor é a fase de aceleração e mais rápido é o crescimento exponencial e quanto mais inclinado é a fase exponencial maior é a velocidade de crescimento.

A fase exponencial mais inclinada no caldo escama de peixe provavelmente se deve a maior disponibilidade de nutrientes visto que as condições de cultivo e o microrganismo usado foram semelhantes nos três ensaios.

Geralmente microrganismos queratinolíticos produzem múltiplas proteases durante o cultivo, demonstrando que a expressão de mecanismos complexos podem ocorrer simultaneamente no controle da produção de diferentes enzimas de modo a aproveitar ao máximo os substratos na nutrição microbiana (GIONGO *et al.*, 2007; DAROIT *et al.*, 2010; MAZOTTO *et al.*, 2010).

Na maioria das vezes, a síntese de queratinases é descrita como um processo induzido pela presença de substratos queratinosos (RIFFEL *et al.*, 2003; GUPTA; RAMNANI, 2006; ADIGUZEL *et al.*, 2009). Entretanto, nem sempre a produção de queratinase está diretamente ligada a adição de queratina (KUBLANOV *et al.*, 2009; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010). Substratos como farelo de soja (NILEGAONKAR *et al.*, 2007; PILLAI; ARCHANA, 2008), caseína e soro de leite (CASARIN; CLADERA-OLIVEIRA; BRANDELLI, 2008), leite desnatado (MITSUIKI *et al.*, 2006), têm sido relatados como indutores da síntese de queratinase.

A indução da produção de queratinases por compostos queratinosos ainda não foi totalmente esclarecida no meio científico. No entanto, pesquisadores sugerem que isso seja

decorrente da limitação de nitrogênio disponível e que a indução pela queratina atue apenas como um efeito indireto (ADIGUZEL *et al.*, 2009; BRANDELLI; DAROIT; RIFFEL, 2010).

Níveis mais elevados de produção de queratinases podem ser observados com a suplementação de meios contendo queratina e fontes adicionais de carbono, como por exemplo, glicose e sacarose (CAI; ZHENG, 2009), e diferentes fontes de nitrogênio como, extrato de levedura e peptona (BERNAL; DIAZ; COELLO, 2006). No entanto, para Brandelli e Riffel (2005) a adição de carboidratos, fontes orgânicas e/ou inorgânicas de nitrogênio pode reduzir a produção de enzimas por determinados microrganismos em decorrência de mecanismos de repressão catabólica. Portanto, a depender do substrato, microrganismo e concentração de carbono e nitrogênio no meio, o efeito da presença de diferentes substratos na síntese de queratinase é muito variável e por isso cada caso deve determinar a composição do meio de modo específico (CAI; ZHENG, 2009).

Muitos estudos relatam a produção de collagenases por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis* (NAGANO; TO, 1999; TRAN; NAGANO, 2002; ROCHIMA *et al.*, 2016), bem como a síntese de queratinases (FERRAREZE; CORREA; BRANDELLI, 2016; CAI *et al.*, 2008; BALAJI *et al.*, 2008), demonstrando que essa espécie apresenta um arsenal enzimático necessário para crescer em substratos recalcitrantes como a escama.

A alta variação residual observada na regressão linear durante o cultivo em caldo nutriente pode ser explicada pela diauxia verificada ao longo do crescimento exponencial, contribuindo para que o tempo de duplicação encontrado possa ter sido superestimado. O crescimento díáuxico é resultante da utilização sequencial de duas ou mais fontes de carbono e energia do meio, como consequência do mecanismo de repressão catabólica (MADIGAN *et al.*, 2016).

Os caldos C1 e nutriente diferem entre si em apenas dois ingredientes em sua composição. No caldo C1, no lugar da peptona tem-se a mesma quantidade (0,5%) em gramas de escamas trituradas e no lugar do extrato de carne a adição de 0,5% de glicose. A adição da glicose ao caldo escama em substituição ao extrato de carne presente no meio comercial visou oferecer uma fonte de carbono inicial do microrganismo como forma de suporte à degradação microbiana.

Nos meios complexos, as proteínas são as fontes essenciais para suprir as necessidades microbianas de energia, nitrogênio, carbono e enxofre. Alguns microrganismos podem utilizar as proteínas diretamente mesmo sendo uma molécula grande e relativamente insolúvel. No entanto, a proteína pode ser reduzida em cadeias de aminoácidos mais curtas denominadas peptonas por meio de uma digestão parcial por ácidos ou enzimas. As peptonas por sua vez

podem ser digeridas pela maioria das bactérias por serem fragmentos pequenos e solúveis (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A peptona (*Peptic Digest of Animal Tissue*) é uma digestão enzimática de tecido de carne usada como ingrediente de uma variedade de fórmulas de meios de cultura devido ao seu alto teor nutritivo e a capacidade de suportar o crescimento de muitos microrganismos exigentes. A peptona é uma fonte alternativa de nitrogênio e vitamina desenvolvida para acomodar diferentes necessidades nutricionais (TRABULSI; ALTERTHUM, 2009).

Espécies de *Bacillus* crescem bem em meios definidos contendo qualquer fonte de carbono. Muitos *Bacillus* clivam polímeros complexos como ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipídios por meio da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, permitindo a utilização desses produtos como fontes de carbono e doadores de elétrons (MADIGAN *et al.*, 2016). Portanto, os meios formulados com escama atendem as exigências nutricionais de *Bacillus subtilis* uma vez que a escama é composta por moléculas orgânicas que atuam como fonte de carbono, nitrogênio e energia.

5. Conclusões

Concluiu-se que o caldo C1 foi o mais eficiente para o crescimento de *Bacillus subtilis* e que o emprego da escama na composição de meio de cultura para o cultivo de *Bacillus subtilis* é viável pois o crescimento em caldo escama mostrou-se o mais eficiente.

6. Referências bibliográficas

ADIGUZEL, A. C; BITLISLI, B. O; YAŞA, I; ERIKSEN, N. T. Sequential secretion of collagenolytic, elastolytic, and keratinolytic proteases in peptide-limited cultures of two *Bacillus cereus* strains isolated from wool. **Journal of Applied Microbiology**. Oxford, v. 107, n. 1, p. 226–234, 2009.

BALAJI, S; KUMAR, M. S; KARTHIKEYAN, R; KUMAR, R; KIRUBANANDAN, S; SRIDHAR, R; SEHGAL, P. K. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. Oxford, v. 38, p. 2741-2745, 2008.

BASU, B; BANIK, A. K. Production of protein rich organic fertilizer from fish scale by a mutant *Aspergillus niger* AB100__ A media optimization study. **Journal of Scientific & Industrial Research**. New Delhi, v. 64, n. 6, p.293-298, 2005.

BERNAL, C; DIAZ, I; COELLO, N. Response surface methodology for the optimization of keratinase production in culture medium containing feathers produced by *Kocuria rosea*. **Canadian Journal of Microbiology**. Ottawa, v. 52, n. 5, p. 445–450, 2006.

BRANDELLI, A; DAROIT, D. J; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial queratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 85, n. 6, p. 1735 – 1750, 2010.

BRANDELLI, A; RIFFEL, A. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium* sp. growing on raw feathers. **Electronic Journal of Biotechnology**. Valparaíso, v. 8, n. 1, p. 35–42, 2005.

CAI, C. G; ZHENG, X. D. Medium optimization for keratinase production in hair substrate by a new *Bacillus subtilis* KD-N2 using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. Hampshire, v. 36, n. 7, p. 875–883, 2009.

CAI, C; CHEN, J. S; QI, J. J; YIN, Y; ZHENG, X. D. Purification and characterization of keratinase from a new *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Zhejiang University**. Hangzhou, v. 9, n. 9, p. 713-720, 2008.

CASARIN, F; CLADERA-OLIVERA, F; BRANDELLI, A. Use of poultry byproduct for production of keratinolytic enzymes. **Food and Bioprocess Technology**. Dublin, v. 1, n. 3, p. 301–305, 2008.

DAROIT, D. J; CORRÊA, A. P. F; SEGALIN, J; BRANDELLI, A. Characterization of a keratinolytic protease produced by the feather-degrading Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **Biocatalysis And Biotransformation**. v. 28, n. 5-6, p.370-379, 2010.

FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura**. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 p. 2016.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. Roma. 218 p. 2012.

FERRAREZE, P. A. G; CORREA, A. P. F; BRANDELLI, A. Purification and characterization of a keratinolytic protease produced by probiotic *Bacillus subtilis*. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**. v. 7, p.102-109, 2016.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GIONGO, J. L; LUCAS, F. S; CASARIN, F; HEEB, P; BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable de-hairing activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Oxford, v. 23, n. 3, p. 375-382, 2007.

GUPTA, R; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 70, n. 1, p. 21–33, 2006.

HUANG, C. Y; KUO, J. M; WU, S. J; TSAI, H. T. Isolation and characterization of fish scale collagen from tilapia (*Oreochromis* sp.) by a novel extrusion–hydro-extraction process. **Food Chemistry**. London, v. 190, p. 997-1006, 2016.

KUBLANOV, I. V; TSIROULNIKOV, K. B; KALIBERDA, E. M; RUMSH, L. D; HAERTLÉ, T; BONCH-OSMOLOVSKAYA, E. A. Keratinase of an anaerobic thermophilic

bacterium *Thermoanaerobacter* sp. strain 1004-09 isolated from a hot spring in the Baikal rift zone. **Microbiology**. v. 78, n. 1, p. 79–88, 2009.

MADIGAN, M. T; MARTINKO, J. M; BENDER, K. S; BUCKLEY, D. H; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 12 ed., Porto Alegre: Artmed, 1006 p. 2016.

MARTINS, M. E. O; CLAUDINO, R. L; MORAIS, J. P. S; CASSALES, A. R; ALEXANDRE, L. C; SOUZA, B. W. S; ALCÂNTARA, L. O; SOUSA, J. R; SOUZA FILHO, M. S. M. Obtenção de gelatina a partir de escama de tilápia (*Oreochromis niloticus*): características químicas e físico-químicas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical, 2015.

MAZOTTO, A. M; CEDROLA, S. M. L; LINS, U; ROSADO, A. S; SILVA, K. T; CHAVES, J. Q; RABINOVITCH, L; ZINGALI, R. B; VERMELHO, A. B. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. **Letters in Applied Microbiology**. Oxford, v. 50, p. 89-96, 2010.

MITSUIKI, S; HUI, Z; MATSUMOTO, D; SAKAI, M; MORIYAMA, Y; FURUKAWA, K; KANOUCHI, H; OKA, T. Degradation of PrPSc by keratinolytic protease from *Nocardiosis* sp. TOA-1. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 70, n. 5, p. 1246–1248, 2006.

NAGANO, H; TO, K. A. Purification of Collagenase and Specificity of Its Related Enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 64, n. 1, p. 181–183, 1999.

NILEGAONKAR, S. S; ZAMBARE, V. P; KANEKAR, P. P; DHAKEPHALKAR, P. K; SARNAIK, S. S. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. **Bioresource Technology**. Essex, v. 98, n. 6, p. 1238–1245, 2007.

PARRADO, J; RODRIGUEZ-MORGADO, B; TEJADA, M; HERNANDEZ, T. GARCIA, C. Proteomic analysis of enzyme production by *Bacillus licheniformis* using different feather wastes as the sole fermentation media. **Enzyme And Microbial Technology**. New York, v. 57, p. 1-7, 2014.

PATI, F; ADHIKARI, B; DHARA, S. Isolation and characterization of fish scale collagen of higher thermal stability. **Bioresource Technology**. Essex, v. 101, n. 10, p. 3737-3742, 2010.

PILLAI, P; ARCHANA, G. Hide depilation and feather disintegration studies with keratinolytic serine protease from a novel *Bacillus subtilis* isolate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 78, n. 4, p. 643–650, 2008.

REGINATO, E; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. Campina Grande, v. 11, n. 1, p. 81-86, 2009.

RIFFEL, A; LUCAS, F; HEEB, P; BRANDELLI, A. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives Microbiology**. v. 179, n. 4, 258–265, 2003.

ROCHIMA, E; SEKAR, N; BUWONO, I. D; AFRIANTO, E; PRATAMA, R. I. Isolation and Characterization of Collagenase from *Bacillus Subtilis* (Ehrenberg, 1835); ATCC 6633 for

- Degrading Fish Skin Collagen Waste from Cirata Reservoir, Indonesia. **Aquatic Procedia**. v. 7, p.76-84, 2016.
- SCORVO FILHO, J. D. Custo operacional de produção da criação de tilápias vermelha da flórida e tailandesa em tanques-rede de pequeno volume. **Informações Econômicas**. São Paulo, v. 36, n. 10, p. 71-79, 2006.
- SIKYTA, B. 2 Kinetics of microbial growth and product formation. **Techniques In Applied Microbiology**. v. 31, p.33-61, 1995.
- SOUSA, C; KLAINER, B; LIMA, K; PINTO, G. Biomass production from *Bacillus* sp. RAB9 using several carbon sources. **BMC Proceedings**, v. 8, p. 172, 2014.
- TORRES, R. C. O. **Utilização de água de coco verde (Cocos nucifera L.) na composição de meios para cultura de *Escherichia coli***. 89 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed., Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.
- TRABULSI, L. R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. Atheneu, 2009. 942 p.
- TRAN, I. H; NAGANO, H. Isolation and Characteristic of *Bacillus subtilis* CN2 and Its Collagenase Production. **Journal of Food Science**. Champaign, v. 67, n. 3, p. 1184–1187, 2002.
- WESTERS, L; WESTERS, H; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta**. Amsterdam, v. 1694, n. 1-3, p. 299-310, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioconversão da escama por meio da fermentação é uma alternativa para reduzir a quantidade de resíduos sólidos industriais.

O emprego da escama na composição de meio de cultura para o cultivo de *Bacillus subtilis* é viável devido a disponibilidade e o baixo custo da matéria-prima, podendo ser utilizada em laboratórios como fonte de carbono, nitrogênio e energia alternativa.

É necessário a realização de mais testes para verificar a atividade proteolítica, identificar as proteases produzidas, otimizar o processo de degradação, determinar o pH ótimo, como também para avaliar a viabilidade das formulações.