



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE GURUPI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

EDUARDO HENRIQUE SANTOS GUEDES

ESTUDO DE ARCHAEA HALÓFILA EM CHARQUE

**GURUPI - TO
2022**

EDUARDO HENRIQUE SANTOS GUEDES

ESTUDO DE ARCHAEA HALÓFILA EM CHARQUE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior

**GURUPI - TO
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

- S237e Santos Guedes, Eduardo Henrique .
Estudo de archaea halófila em charque. / Eduardo Henrique Santos Guedes. – Gurupi, TO, 2022.
70 f.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Gurupi - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Biotecnologia, 2022.
Orientador: Aloísio Freitas Chagas Junior
1. Caracterização. 2. Halófilos. 3. Charque. 4. Deterioração e Controle. I. Título

CDD 660.6

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Eduardo Henrique Santos Guedes

Estudo de archaea halófila em charque

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em 25/03/2022 foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Data da aprovação: 25/03/2022.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Junior – Orientador(a) – UFT

Prof. Dr. Albert Lennon Lima Martins – Examinador – UNITINS

Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt – Examinador – UFT

Gurupi (TO).
2022

AGRADECIMENTO

A Deus por toda fonte de sabedoria, a minha família pelo apoio e companheirismo e aos amigos da caminhada acadêmica.

Ao Prof. Dr. Aloísio Freitas Chagas Júnior, por todas as orientações e ensinamentos repassados ao longo dessa caminhada, agradeço por toda dedicação.

À Universidade Federal do Tocantins, ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, aos professores, profissionais, colegas do programa e amigos que colaboraram para meu desenvolvimento acadêmico nessa jornada.

Obrigado a todos!

RESUMO GERAL

A utilização de cloreto de sódio em produtos cárneos como o charque, além do seu efeito sensorial e conservante confere a eles uma estabilidade prolongando a vida de prateleira do produto. Apesar de conservante, o sal não estéril pode conter microrganismos adaptados a altas concentrações salinas, denominados halófilos, estes podem ocasionar problemas de deterioração, como odores e aromas desagráveis nos produtos. Objetivou-se isolar, caracterizar, avaliar parâmetros de crescimento e produção de exoenzimas hidrolíticas como também aferir a sensibilidade a conservantes ácidos orgânicos (lático, cítrico e glucona-delta-lactona) em cepas isoladas a partir do charque em estado de deterioração. Duas cepas foram isoladas, a cepa C11 de colônia creme branca e cocoide, e a V22 pigmentado de vermelho e morfologicamente pleofofíca. Ambas foram neutrófilas, gram-negativas, catalase e oxidase positivas e após um planejamento experimental fatorial 2x3, avaliando a influência de diferentes concentrações de NaCl, MgCl₂ e extrato de levedura. Observou-se que para ambas as melhores condições de crescimentos das variáveis estudadas foram de 25 a 35 g L⁻¹ de MgCl₂, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, mas que em relação ao NaCl a cepa C11 não cresceu em meio contendo 300 (idealmente a 200) g L⁻¹ de NaCl e a cepa V22 não cresceu em meio contendo 100 (idealmente a 300) g L⁻¹ de NaCl. Quanto à produção enzimática testadas em meios sólidos específicos com diferentes substratos, os resultados mostram que as duas cepas foram negativas quando a produção das exoenzimas, exceto a cepa V22 que apresentou um bom índice enzimático (4,5) para produção de gelatinase. Na avaliação da suscetibilidade das cepas deteriorantes aos devidos ácidos utilizou-se a técnica de disco difuso em ágar (método de Kirby-Bauer) com diferentes ácidos variando suas concentrações de 0,5 a 5% diluídos em salmoura a 20% de NaCl e os resultados mostram que em geral a utilização da concentração a partir de 2,5% pode ser utilizada para aumentar a vida útil do charque, mas que os ácidos láticos e cítrico apresentaram maiores valores significativos em relação a inibição do crescimento das cepas testadas *in vitro* nas diferentes concentrações.

Palavras-chave: Caracterização; Halófilos; Charque; Deterioração; Controle

ABSTRACT

The use of sodium chloride in meat products such as beef jerky, in addition to its sensory and preservative effect, gives them stability, prolonging the shelf life of the product. Despite being a preservative, non-sterile salt may contain microorganisms adapted to high saline concentrations, called halophiles, which can cause deterioration problems, such as unpleasant odors and aromas in the products. The objective was to isolate, characterize, evaluate growth parameters and production of hydrolytic exoenzymes, as well as assess the sensitivity to organic acid preservatives (lactic, citric and gluconic- δ -lactone) in strains isolated from jerked beef in a state of deterioration. Two strains were isolated, the C11 strain of cream white and coccoid colony, and the V22 red-pigmented and morphologically pleomorphic. Both were neutrophils, gram-negative, catalase and oxidative positive and after a 2x3 factorial experimental design, evaluating the influence of different concentrations of NaCl, MgCl₂ and yeast extract, it was observed that for both the best growth conditions of the variables studied were of 25 to 35 g L⁻¹ of MgCl₂, 5 g L⁻¹ of yeast extract, but in relation to NaCl the C11 strain did not grow in a medium containing 300 (ideally 200) g L⁻¹ and the V22 strain did not grow in medium containing 100 (ideally 300) g L⁻¹. As for the enzyme production tested in specific solid media with different substrates, the results show that the two strains were negative when producing exoenzymes, except for the V22 strain that showed a good IE (4.5) for gelatinase production. In the evaluation of the susceptibility of the deteriorating strains to the due acids, the technique of diffuse disk in agar was used (Kirby-Bauer method) with different acids varying their concentrations from 0.5 to 5% diluted in brine to 20% of NaCl and the Results show that, in general, the use of a concentration from 2,5% can be used to increase the shelf life of the jerky, but that lactic and citric acids presented higher significant values in relation to the inhibition of the growth of the strains tested in vitro at different concentrations.

Keywords: Description; Halophiles; Beef jerky; Deterioration; Control

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Taxa de crescimento de microrganismos em relação à salinidade.....	13
Figura 2: Charque bovino em estado de deterioração ocasionado por microrganismos halófilos.	14
Figura 3: Árvore filogenética universal na forma enraizada dos três domínios primeiramente proposta por Woese et al. (1990).....	16
Figura 4: Árvore filogenética detalhada de Archaea, baseada na comparação de proteínas ribossomais provenientes de genomas sequenciados.	17
Figura 5: Micrografia de Haloarchaea: (A) Halobacterium salinarum, (B) Halococcus, (C) Haloferax, (D) Haloarcula e (E) Haloquadratum walsbii.....	21
Figura 6: Exemplos naturais de ambientes hipersalinos colonizados por haloarchaeas.....	21
Figura 7: Amostras de charque contaminado por haloarchaea.....	37
Figura 8: Características morfológicas das cepas isoladas (A) e em cultura pura (B).	38
Figura 9: Microscopia dos isolados após a coloração Gram das cepas C11 (A) e V22 (B).....	39
Figura 10: Curvas de crescimento das cepas C11 e V22 em meio MEC 20% de NaCl em função dos valores obtidos pela densidade óptica.	40
Figura 11: Superfície de resposta para (a) NaCl e extrato de levedura em (g L^{-1}) e (b) NaCl e MgCl_2 em (g L^{-1}) e em relação ao crescimento das cepas halófilas C11 ($\text{UFC mL}^{-1} \times 10^6$).	42
Figura 12: Superfície de resposta para (a) NaCl e extrato de levedura e (b) NaCl e MgCl_2 (g L^{-1}) e (c) MgCl_2 e extrato de levedura em relação ao crescimento das cepas halófilas V22 ($\text{UFC mL}^{-1} \times 10^4$).....	43
Figura 13: Perfil dos valores otimizados pelo teste de desejabilidade para potencial de extrato de levedura, NaCl e MgCl_2 no crescimentos da cepa C11.	46
Figura 14: Perfil dos valores otimizados pelo teste de desejabilidade para potencial de extrato de levedura, NaCl e MgCl_2 no crescimentos da cepa V22.	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças celulares entre os três domínios.	16
Tabela 2: Principais gêneros pertencentes à classe Halobacteria.	19
Tabela 3: Delineamento experimental 2x3, para os ensaios de crescimento das cepas.	36
Tabela 4: Características morfológicas e fisiológicas das cepas halofílicas	38
Tabela 5 - Valores de Índice enzimático, média das 3 repetições.	56
Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão do halo de inibição em diferentes concentrações para cepa C11.	59
Tabela 7 - Tabela de análise de variância para cepa C11.	59
Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão do halo de inibição em diferentes concentrações para cepa V22.	59
Tabela 9 - Tabela de análise de variância para cepa V22.	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	7
2	CAPÍTULO 1: ARTIGO 1	9
3	CAPÍTULO 2: ARTIGO 2	30
4	CAPÍTULO 3: ARTIGO 3	52
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

Um novo tipo de organismo celular procarioto foi encontrado no final da década de 1970, onde sua parede celular se diferenciava das demais bactérias por não conter peptidoglicano, como também não compartilarem inúmeras sequências de rRNA as quais eram sequências diferentes das bactérias e dos eucariotos, impulsionando os cientistas a reclassificar os seres vivos em três domínios (Archaea, Eubacteria e Eukarya) em grupos taxonômicos semelhantes (TORTORA et al., 2017).

No final da década de 1990 Woese et al. definiram o Domínio Archaea, que do grego significa antigo ou primitivo, como células procarióticas, com predominância de lipídios na membrana, diésteres de glicerol isoprenóide ou tetraésteres de diglicerol, com ribossomos contendo um tipo de archaeal de rRNA, diferenciando-se quando comparadas ao domínio bactéria em relação às características moleculares, fisiológicas e estruturais (MADIGAN et al., 2016).

Nas primeiras tentativas em caracterizar as descobertas sobre o domínio archaea, erroneamente foram denominados de ancestrais das bactérias (reino Archaeobacteria), entretanto ao longo da evolução da biologia celular e molecular e com a descoberta de características peculiares e exclusivas foi evidenciado que as archaea compartilham um ancestral comum entre Eucarya e a Bacteria (PIRES, 2012).

As archaeas são comumente encontradas em ambientes extremos, por isso, de modo geral são classificadas em três como os halofílicos que sobrevivem em ambientes hipersalinos, os metanogênicos produzem metano como resultado da respiração, e por fim os termofílicos, organismos que suportam sobreviver em águas sulfurosas e quentes. Apesar de serem microrganismos extremófilos até o momento não foi relatado espécie patogênica aos humanos (TORTORA et al., 2017).

A habilidade de habitarem ambientes com altas concentrações de NaCl é visto em organismos membros do domínio bactéria como também da archaea, e são distinguidos como “halobacteria” e “haloarchaea” (KRZMARZICK et al., 2018). Logo ambientes hipersalinos são habitats colonizados por uma diversidade microbiana em função de fatores ambientais, incluindo a concentração de sal. Podem existir em lagoas, bacias submarinas, desertos de sal, e em salinas solares construídas pelo homem para a exploração comercial de sal para uso alimentício (GHANMI et al., 2020).

Assim, alimentos salgados se tornam um ambiente propício para o desenvolvimento de organismos halófilos, visto que archaea extremamente halófilas são onipresentes na natureza e quando o sal não estéril é utilizado para conservar produtos alimentícios, a contaminação se torna inevitável ocasionando a deterioração, conhecida e caracterizada pelo aparecimento de colônias pigmentadas de vermelho à rosa e por serem fortemente proteolíticas produzindo odores e aromas nesses produtos (MOSCHETTI et al., 2006).

As espécies halófilas podem variar principalmente quando se considera a diversidade de ambientes no qual se estuda tais organismos, então dependendo da fonte de sal usado para salga, o tipo de microrganismo halófilos podem ser diferente de um local para outro e o conhecimento acerca das espécies envolvidas na deterioração é essencial para elaborar estratégias de controle (CAGLAYAN et al., 2017).

Atrelado aos fatos explanados acima, sugere-se assim que esses microrganismos detenham grande valor comercial seja pela sua ação deteriorante como também para produção de moléculas estáveis de interesse biotecnológico, tornando-se assim a sua identificação e caracterização de grande importância para diversas áreas industriais como alimentícia, farmacêutica e para tratamento de efluentes. A maioria dos estudos foram concentrados no estudo de archaea halófilas isoladas de solo e lagos salinos (SINGH e SINGH, 2018, SAHLI et al., 2020).

Neste contexto esse estudo teve como objetivo isolar, caracterizar, avaliar os parâmetros no crescimento, estima-se a produção de exoenzimas hidrolíticas e avaliar a sensibilidade de cepas halófilas isoladas a partir de charque frente a ácidos organismos em diferentes concentrações.

2 CAPÍTULO 1: ARTIGO 1¹

Halófilos deteriorantes em produtos cárneos salgados

Deterioration halophils in salty mear products

RESUMO

A utilização de cloreto de sódio em produtos cárneos além do seu efeito sensorial e conservante confere a eles uma estabilidade, pois diminui o crescimento microbiano e as reações química de degradação, prolongando a vida de prateleira. Apesar de ser utilizado para conservação de vários produtos, o sal quando não estéril pode conter microrganismos adaptados a altas concentrações salinas, denominados halófilos, estes podem ocasionar problemas de deterioração, como odores e aromas desagráveis. São popularmente conhecidos como vermelhão por sua pigmentação colonial, e podem ser um problema econômico a indústrias de carnes e derivados salgados. O objetivo deste estudo é apresentar as principais características e medidas de controle de archaeas halófilas deteriorantes em produtos cárneos salgados por meio de um levantamento bibliográfico. Os procariotos pertencentes ao domínio Archaea e ao filo Euryarchaeota são relatados como os principais organismos halofílicos descritas primeiramente como *Halobacterium* crescendo idealmente de 2 a 4 Mmol L⁻¹ de NaCl. Não sofrem desidratação, pois possui elevada concentração intracelular de sais (KCl) maior que a concentração de NaCl no seu habitat, são organismos de morfologia variada, maioria é gram-negativas, neutrófilas e mesófilas, havendo exceções. Para prevenir o aparecimento barreiras físico-químicas podem ser utilizadas destacando-se a embalagem a vácuo como também a utilização de ácidos orgânicos. A maior parte dos estudos sobre archaeas halofílicas tem se concentrado em pesquisas ambientais e ecológicas e poucos estudos são concentrados no isolamento e identificação a partir de alimentos salgados, nem tão pouco em medidas de controle que podem ser utilizadas para combater espécies deteriorantes.

Palavras-chaves: halófilos; archaea; alimentos cárneos salgados; deterioração; controle

¹ Artigo publicado: Guedes, E. H. S., dos Santos, A. L., da Silva Soares, C. M., de Aguiar, A. O., Junior, A. F. C., Scheidt, G. N., & Chagas, L. F. B. (2021). Halófilos deteriorantes em produtos cárneos salgados. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 9(4), 410-421.

ABSTRACT

The use of sodium chloride in meat products, in addition to its sensory and preservative effect, gives them stability, as it reduces microbial growth and chemical degradation reactions, prolonging shelf life. Despite being used for the conservation of several products, when non-sterile salt can contain microorganisms adapted to high salt concentrations, called halophiles, which can cause deterioration problems, such as unpleasant odors and aromas. They are popularly known as vermilion for their colonial pigmentation, and can be an economic problem for meat and salty byproducts industries. The aim of this study is to present the main characteristics and control measures of deteriorating halophilic archaea in salted meat products through a bibliographic survey. Prokaryotes belonging to the Archaea domain and the Euryarchaeota phylum are reported as the main halophilic organisms first described as Halobacterium growing ideally at 2 to 4 Mmol L⁻¹ of NaCl. They do not suffer from dehydration, as they have a high intracellular concentration of salts (KCl) greater than the concentration of NaCl in their habitat, they are organisms of varied morphology, most are gram-negative, neutrophilic and mesophilic, with exceptions. To prevent the appearance of physicochemical barriers, they can be used, highlighting the vacuum packaging as well as the use of organic acids. Most studies on halophilic archaeas have focused on environmental and ecological research and few studies are focused on isolation and identification from salty foods, nor on control measures that can be used to combat spoilage species.

Key-words: halophiles; archaea; salty meat foods; spoilage; control

INTRODUÇÃO

Relatos históricos evidenciam a utilização do sal cloreto de sódio, (NaCl), desde a idade antiga, como meio de conservação para alimentos. Sabe-se que sua principal utilidade era a salga de carne crua de animais domésticos, sobretudo suínos e peixes, assim de forma empírica o homem descobriu os efeitos favoráveis desse processo (Ordoñez et al., 2005).

A técnica da salga em produtos de origem animal é um dos métodos mais longínquos para conservação desses alimentos, e consiste na retirada de uma quantidade de água da porção muscular com substituição de sal no processo conhecido por osmose, desencadeando a diminuição da atividade de água do produto e conseqüentemente ocorre um ganho da estabilidade microbiana, bioquímica e química além de contribuir nas alterações desejáveis de sabor e aroma do produto (Aiura et al., 2008; Rebouças et al., 2020).

O NaCl é um dos ingredientes que proporciona o sabor salgado disponível nas dietas, consiste em um elemento indispensável na formulação de produtos cárneos salgados tendo

efeito direto nos componentes químicos da carne, principalmente nas proteínas, e influência positivamente a suculência, maciez, o sabor e a vida útil do produto (Rios-mera et al., 2020; Zhao et al., 2020). Segundo Armenteros et al. (2012), outros sais podem substituir o cloreto de sódio na salga de carnes, como o cloreto de potássio (KCl) que exibe características físicas semelhantes ao NaCl e apresenta melhores resultados em termo de qualidade sensorial e físico-químicos quando comparados a outros sais como o cloreto de cálcio (CaCl_2) e o cloreto de magnésio (MgCl_2).

No mundo e também no Brasil, a utilização de métodos de conservação combinado com a salga, como secagem por estufa e sol, refrigeração e embalagens a vácuo proporciona a elaboração de diversos produtos alimentícios cárneos salgados como linguiças, salames, presuntos, carne de sol e o charque, diferenciando-se pelo processo de obtenção e as quantidades de sal utilizadas na elaboração do produto (Silva et al., 2013).

Apesar do NaCl ser um ótimo inibidor de microrganismos, produtos cárneos salgados não estão isentos de sofrerem processos de deterioração microbiana, pois existe certas espécies capazes de sobreviverem em altas concentrações de sal, os halófilos, que quando presentes deterioram as carnes salgadas provocando alterações indesejáveis, a sua aparição pode ser caracterizada pelo surgimento de manchas avermelhadas ou rasadas além do forte odor de putrefação pois produzem enzimas proteolíticas e ainda se desenvolvem idealmente em temperatura ambiente, tornando-se assim um problema econômico as indústrias que processam carnes e seus derivados salgados (Moschetti et al., 2006; Enquahone et al., 2020).

Neste contexto, o objetivo deste artigo é apresentar as principais características e medidas de controle de archaeas halófilas deteriorantes em produtos cárneos salgados por meio de um levantamento bibliográfico.

PRODUTOS CÁRNEOS SALGADOS

A utilização de NaCl em produtos alimentícios de origem animal (POA) além do seu efeito conservante conferem a eles uma estabilidade em temperatura ambiente, o que se torna importante nas regiões com dificuldades de conservação pela utilização de temperaturas de refrigeração e congelamento (Nunes e Pedro, 2011).

Como ingrediente principal no preparo de carnes secas, o sal pode ser aplicado à carne de duas maneiras, em salga úmida onde ocorre a injeção ou imersão dos cortes em salmouras e na salga seca que consiste na formação de pilhas de carnes intercaladas por camadas de sal, acarretando alterações desejáveis nas propriedades texturais, aromáticas e conservantes (Shimokomaki et al., 2006; Brasil 2020). A desidratação do tecido muscular, devido à difusão

do sal nos tecidos, promove a redução da atividade de água levando a perda de água livre por osmose, que implicará na inibição do crescimento microbiano e diminuição de reações químicas de degradação (Aykin-Dinçer e Erbas, 2018).

A Biltong produzida na África do Sul, o Jerky e a Pemmican na América do Norte e o charque, Jerked beef e carne de sol encontradas no Brasil são exemplos de carnes salgadas, diferenciando-se na fabricação (Petit et al., 2014).

Além de proporcionar elevada eficiência proteica, excelente valor biológico e fácil digestão, no mercado mundial, diversos são os POA que utilizam o sal como ingrediente indispensável, tendo sua concentração variável de acordo com o produto: em almôndegas contém 0,62 g de NaCl por 100 g de produto, linguiça suína com 1,18 g por 100 g, embutidos fermentados com 1,5 g por 100 g, presunto maturado com 2,2 g por 100 g e o charque que com 5,85 g por 100 g de produto não dessalgado (Garcia et al., 2013).

O charque é um importante produto produzido desde a antiguidade em muitos países de importância econômica que utiliza como técnica de conservação a tecnologia das barreiras, a redução da atividade de água por adição de sal, secagem e embalagem a vácuo (Vidal et al., 2019). Segundo Brasil (2020) charque é o produto cárneo obtido de carne bovina, com adição de sal e submetido a processo de dessecação seguindo as etapas de desossa e manteação, salga úmida ou salmouragem, salga seca, remoção do excesso de sal, secagem e embalagem.

Além de proporcionar alterações desejáveis no sabor e odor dos produtos cárneos a utilização do sal primitivamente foi utilizada para conservação a fim de evitar o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes nos alimentos (Ordoñez et al., 2005).

Eventualmente os microrganismos estão presentes por todo planeta habitando diferentes ambientes, inclusive em ecossistemas salinos, e muitas dessas espécies ainda não foram identificadas e estudadas. Organismos extremófilos tem ganhado notoriedade nos últimos tempos tendo seu metabolismo e filogenia cada vez mais pesquisado, como é o caso dos organismos halófilos (do grego halo - sal + filo – amigo) que podem causar deterioração em produtos cárneos salgados. Produtos alimentícios salgados e fermentados geralmente contêm archaea halofílicas que se desenvolve na presença de NaCl e conseguem ocasionar a deterioração do produto mesmo em altas concentrações de sal (Moschetti et al., 2006; Lee, 2013; Lorentzen et al., 2015; Tortora et al., 2017).

DETERIORAÇÃO MICROBIANA EM PRODUTOS CÁRNEOS SALGADOS

Por possuir fatores intrínsecos tais como pH favorável, alta atividade de água, elevado teor de nutrientes e não possuir constituintes antimicrobiano, a carne *in natura* é meditada como

um excelente meio de cultivo microbiano, divergindo-se das carnes salgadas que a tornam um ambiente pouco propício para a proliferação microbiana por possuir barreiras como a alta concentração de sal, assim apenas organismos considerados extremófilos, com afinidade salina, consegue prosperar nesse habitat (Franco e Landgraf, 2008; Lee, 2013).

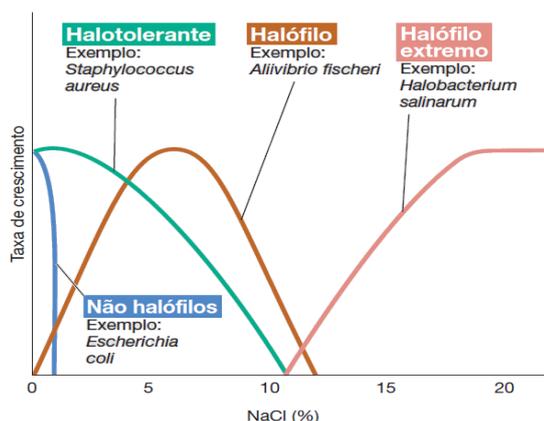
Organismos extremófilos são aqueles que vivem em ambientes com condições extremas de pH ($>pH 8,5$, $<pH 5,0$ $5,0 < pH < 8,0$), temperatura ($>45\text{ }^{\circ}\text{C}$, $<15\text{ }^{\circ}\text{C}$ $15 < ^{\circ}\text{C} < 45$), pressão (>500 atmosferas), em altas concentrações de metais pesados e compostos recalcitrantes e salinidade ($>58,4\text{ g L}^{-1}$ de NaCl). Por suportarem essas condições são considerados produtores de biomoléculas de potencial biotecnológico devido a sua estratégia de adaptação e a capacidade de biossíntese de diversos metabólitos (De Carvalho e Fernandes, 2010).

Os halófilos são classificados em três categorias, quanto a concentração ótima de NaCl que necessitam para o seu crescimento, os não halófilos tem crescimento ótimo em menos de 1% ($0,2\text{ Mmol. L}^{-1}$) de NaCl, halotolerantes com crescimento ótimo a 1-3% ($0,2-0,5\text{ Mmol. L}^{-1}$) de NaCl, halofílicos com crescimento ótimo a 3-15% ($0,5-2,5\text{ Mmol. L}^{-1}$) de NaCl e os halófilos extremos com crescimento ótimo a 15-30% ($2,5-5,2\text{ Mmol. L}^{-1}$) de NaCl. Os procaríotos pertencentes ao domínio bactéria e archaea são relatados como os principais organismos com afinidade ao NaCl (Amoozegar et al., 2017).

Segundo Lorentzen et al. (2015), no sal para uso alimentar pode haver a existência de microrganismos viáveis, onde Petter (1931) utilizou o sal de qualidade alimentar da Trapani, Sicília (Itália), sendo o primeiro produto alimentar a partir do qual um membro da família Halobacteriaceae foi isolado, conhecido originalmente como *Halorubrum trapanicum*.

Alguns exemplos de microrganismos em relação à salinidade tolerada podem ser vistos na Figura 1.

Figura 1: Taxa de crescimento de microrganismos em relação à salinidade



Fonte: Madigan et al. (2016).

Alimentos elaborados com altas concentrações de sal se tornam um ambiente propício para o desenvolvimento de organismos halófilos, visto que archaea extremamente halófilas são onipresentes na natureza onde a presença de NaCl é alta, como em lago salinos, salinas e alimentos salgados. Assim quando o sal não estéril é utilizado para conservar produtos alimentícios, a contaminação por microrganismos halófilos é inevitável e assim podem ocasionar diversos problemas de deterioração como em carnes salgadas e produtos pesqueiros. Essa deterioração é conhecida e caracterizada pelo aparecimento de colônias pigmentadas de vermelho à rosa e por serem fortemente proteolíticas produzindo odores e aromas nesses produtos (Moschetti et al., 2006).

O autor supracitado elucidou que na maior parte dos estudos está voltado com o envolvimento desses microrganismos na deterioração de carnes salgadas e produtos pesqueiros, mas estudos sistemáticos sobre a ocorrência de tais microrganismos em ecossistemas alimentares são raramente encontrados. Como é observado o frequente isolamento de cepas da família Halobacteriaceae, mas seu papel na salga destes produtos ainda é pouco investigado.

Segundo Akpolat et al. (2015), a coloração vermelha em produtos alimentícios salgados vem chamando à atenção desde 1880, onde manchas em bacalhau salgado, couro salgado e peixe salgado já era examinados, e devido ao seu valor comercial alguns cientistas propuseram a estudar a causa, efeito e prevenção do vermelhão nesses produtos que são comumente observados na porção exposta ao oxigênio e podendo variar a coloração, como manchas vermelhas brilhantes, marrom-alaranjadas, violeta-azuladas, manchas extensas e estrias, presentes em áreas geralmente úmidas e pegajosas. A Figura 2 apresenta a contaminação de organismos halófilos pigmentados de vermelho em charque.

Figura 2: Charque bovino em estado de deterioração ocasionado por microrganismos halófilos.



Fonte: Autores

Diversos procariotos halófilos veem sendo descoberto após a evolução da filogenética, aumentando continuamente o número de gêneros e espécies conhecidos tanto no domínio bactéria quanto no archaea. A maior parte são as archaeas que são altamente halofílicas necessitando de 1,5 M a 2,5 M de NaCl para seu desenvolvimento (Lee, 2013; Amoozegar et al., 2017).

A descoberta e as ideias propostas por Woese et al. (1990), dos três domínios, fizeram com que o domínio archaea se tornasse um campo de pesquisa fascinante para microbiologia moderna pela sua peculiaridade metabólica e de sobrevivência, atrelada ao dificultoso trabalho em cultivar archaea em laboratório. Antimicrobianos, enzimas, pigmentos solutos compatíveis e lipídeos estáveis podem ser fornecidos por esses archaea halófilos e podem apresentar potencial biotecnológico (Brochier-Armanet, 2011; Quadri et al., 2016).

DOMÍNIO ARCHAEA

Um novo tipo de organismo celular procarioto foi encontrado no final da década de 1970. O fato espantoso foi descobrir que sua parede celular se diferenciava das demais bactérias por não conter peptidoglicano, como também eles não compartilhavam inúmeras sequências de rRNA as quais eram sequências diferentes do domínio bactéria e dos eucariotos. Com essas novas descobertas significativas, os cientistas propuseram a criação de um novo domínio para incluir esses novos organismos em grupos taxonômicos semelhantes, criando o Domínio Archaea (Tortora et al., 2017).

Domínio Archaea, do grego significa antigo, primitivo, são células procarióticas, com predominância de lipídios na membrana, diéteres de glicerol isoprenóide ou tetraéteres de diglicerol, com ribossomos contendo um tipo de archaeal de rRNA, diferenciando-se quando comparadas ao domínio bactéria em relação as características moleculares, fisiológicas e estruturais (Woese et al., 1990).

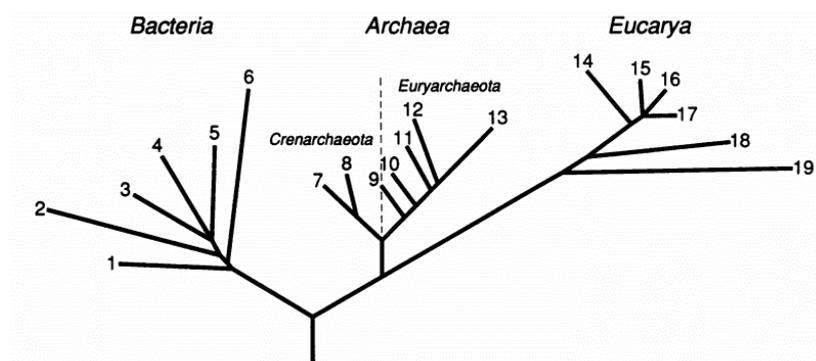
Nas primeiras tentativas em caracterizar as descobertas sobre o domínio archaea, erroneamente foram denominados de ancestrais das bactérias (reino Archaeobacteria), entretanto ao logo da evolução da biologia celular e molecular e com a descoberta de características peculiares e exclusivas foi evidenciado que as archaea compartilham um ancestral comum entre Eucarya e a Bacteria (Pires, 2012).

Segundo Madigan et al. (2016), a cerca de 2,8 bilhões de anos, ocorreu uma bifurcação, quando archaea e eukarya divergiram como domínios distintos e assim mediante a evolução das linhagens diversas características biológicas fixaram-se especificadamente em cada grupo originando diferenças genéticas entre os três domínios. Apesar de mais de 4 bilhões de anos de

evolução, hoje evidencia-se a semelhança celular entre os domínios, mas por outro lado têm histórias evolutivas distintas e próprias.

A Figura 3 apresenta um esquema da árvore filogenética universal dos três domínios proposta na década de 1990.

Figura 3: Árvore filogenética universal na forma enraizada dos três domínios primeiramente proposta por Woese et al. (1990).



Fonte: Woese et al. (1990).

As archaea apresentam características metabólicas extraordinárias e filogenia particular, sendo considerados únicos a sobreviverem em condições extremas de temperatura, pH, osmolaridade e outros, assim por apresentar determinadas funções de organização do genoma, expressão gênica, composição celular e filogenia são organismos evolutivamente distintos das demais bactérias do domínio Bactéria (Paixão et al., 2015). A Tabela 1 apresenta as principais características celulares dos três domínios.

Tabela 1: Diferenças celulares entre os três domínios.

Características	Núcleo	Parede celular	Lipídeos membrana	Cromossomos	Plasmídeos	Ribossomos
Bactéria	Não	Pepitideoglicano	Ligação éter	Circular	sim	70 S
Archaea	Não	Não contém peptideoglicano	Ligação éter	Circular	Sim	70 S
Eucarya	Sim	Varia na composição; contém carboidratos.	Ligação éter	Linear	Não	80 S

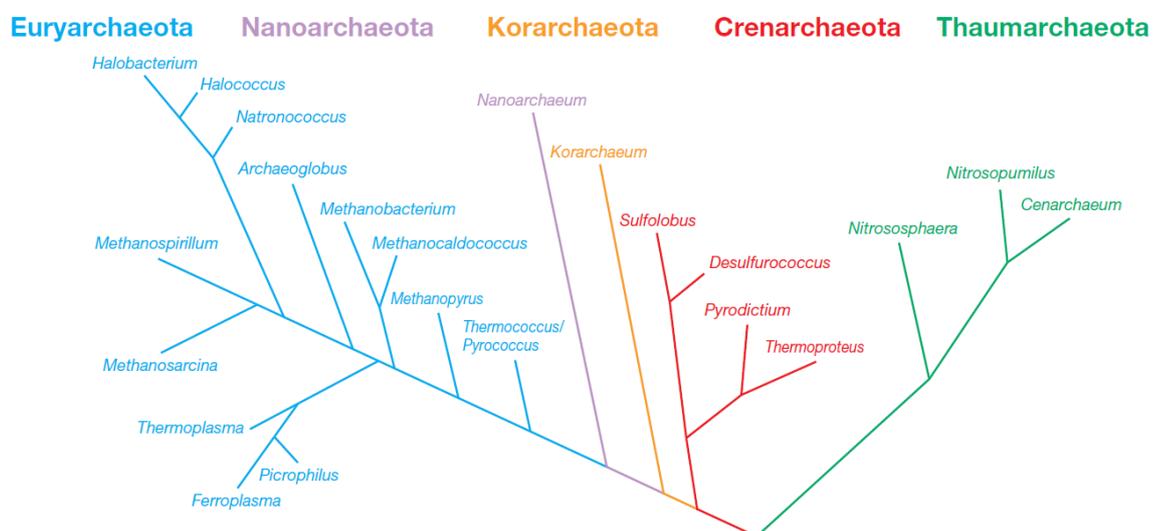
Fonte: Adaptado de Madigan, et al. (2016).

Os microrganismos pertencentes ao domínio archaea são comumente encontradas em ambientes extremos, por isso, de modo geral são classificadas em três grupos principais por suas características peculiares: os halofílicos são aqueles que sobrevivem em ambientes onde as concentrações de NaCl são altas, os metanogênicos produzem metano como resultado da

respiração, e por fim os termofílicos (termo = quente), organismos que suportam sobreviver em águas sulfurosas e quentes. Apesar de serem microrganismos extremófilos até o momento não foi relatado espécie que cause nenhuma patologia aos humanos (Tortora et al., 2017).

Quando propôs o domínio archaea Woese et al. (1990), sugeriram a divisão desse domínio em dois filios, Euryarchaeota e Crenarchaeota, mas com o advento da ciência atualmente os organismos desse domínio são classificados dentre os filios o Euryarchaeota, Crenarchaeota e os novos, Thaumarchaeota (Brochier-Armanet et al., 2008), Korarchaeota (Barns et al., 1996; Elkins et al., 2008) e Nanoarchaeota (Hohn et al., 2002). Com isso periodicamente novos organismos veem sendo descobertos e incluídos a um desses filios a partir da análise filogenética moleculares. Vale ressaltar que os filios Euryarchaeota e Crenarchaeota são aqueles onde ocorre a maioria das espécies descritas e estudadas, enquanto apenas algumas espécies nos filios Nanoarchaeota, Korarchaeota e Thaumarchaeota. A Figura 4 apresenta uma atual árvore filogenética do domínio archaea baseada na comparação das sequências de proteínas ribossomais (Madigan et al., 2016).

Figura 4: Árvore filogenética detalhada de Archaea, baseada na comparação de proteínas ribossomais provenientes de genomas sequenciados.



Fonte: Madigan et al. (2016).

Os filios Korarchaeota e Nanoarchaeota são representados por uma única espécie conhecida de cada (Madigan et al., 2016). O filo Korarchaeota foi proposto por Barns et al. (1996), após uma análise filogenética de sequências de RNA ribossomal obtidas de um organismo não cultivado de uma fonte termal no Parque Nacional de Yellowstone (EUA), onde seus resultados revelou um novo grupo de archaea, que pode ter divergido antes da divisão das

linhagens de Crenarchaeota e Euryarchaeota. Elkins et al. (2008), relatam primeiramente a caracterização de um membro da Korarchaeota com o nome proposto *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*, que exibe uma morfologia filamentosa ultrafina anaeróbios hipertermofílicos. Até o momento, membros desse filo foram encontrados apenas em ambientes com altas temperaturas como fontes termais terrestres.

O Nanoarchaeota que inicialmente foi relatado pela primeira vez por Hohn et al. (2002), como um único organismo simbiote ou parasita obrigatório (de genoma altamente reduzido, e capacidade biosintética reduzida) tendo como hospedeiro um organismo do filo Crenarchaeota hipertermofílico marinho o *Ignicoccus hospitalis*. Segundo Munson-Mcgee et al. (2015), a inclusão desse novo filo foi parcialmente aceita e relatam no seu manuscrito que os organismos do filo Nanoarchaeota habitam diferentes ambientes além das fontes termais marinhas, onde outros autores expõem a evidência deste filo em fontes termais terrestres e ambientes hipersalinos mesófilos.

Já o Filo Thaumarchaeota (Brochier-Armanet et al., 2008), os organismos estão presentes em águas marinhas e doces, solos e ambientes quentes, e tiveram bastante atenção após a descoberta de que alguns deles são capazes de oxidar aerobiamente a amônia demonstrando ser o primeiro organismos do domínio archaea no processo de nitrificação, habilidade anteriormente restrita e conhecida a algumas linhagens proteobacterianas, como principal gênero tem-se o *Nitrosopumilus*, *Nitrososphaera* (Brochier-Armanet et al., 2012).

Os microrganismos pertencentes ao filo Crenarchaeota são extremófilos e são caracterizados por incluir espécies com temperaturas ótimas de crescimento próximo a 100 °C, os hipertermófilos, que podem ser quimiolitotróficos e autotróficos, sem nenhum fototrófico. São capazes de metabolizar o enxofre e viverem em ambientes tanto alcalinos ou ácidos, entretanto a maioria vive em ambientes neutros ou moderadamente ácidos como os gêneros *Sulfolobus* e *Acidianus*. Por fim, tem-se o filo com maior quantidade de organismos conhecidos, e englobam indivíduos fenotipicamente heterogêneos, o filo Euryarchaeota que consiste em um grupo diverso onde acomoda organismos hipertermófilos *Thermococcus* e *Pyrococcus*, o metanogênico hipertermófilo *Methanopyrus* e *Thermoplasma*, um organismo desprovido de parede celular, fenotipicamente similar aos micoplasmas, como também archaeas extremamente halófilas, que crescem bem em altas concentrações de sal (Woese et al., 1990; DeLong, 1992; Madigan et al., 2016).

ARCHAEA HALÓFILAS EXTREMOFILAS

A habilidade de habitarem ambientes com altas concentrações de NaCl é visto em organismos membros do domínio Bactéria como também da Archaea, e são distinguidos como “halobacteria” e “haloarchaea” (Krzmarzick et al., 2018). Logo ambientes hipersalinos são habitats colonizados por uma diversidade microbiana em função de fatores ambientais, incluindo a concentração de sal. Podem existir em lagoas, bacias submarinas, desertos de sal, e em salinas solares construídas pelo homem para a exploração comercial de sal (Ghanmi et al., 2020).

Pertencente ao filo Euryarchaeota as archaeas halófilas foram descritas primeiramente como *Halobacterium*, esse termo foi utilizado anteriormente ao descobrimento das archaea, assim além do termo haloarchaea, essas archaea são comumente denominadas “halobactérias”, gênero este bem mais estudado dentro o domínio. Eles estão incluídos na classe Halobacteria, dividida em três ordens: Halobacteriales, Haloferacales e Natrialbales, e uma das espécies mais estudadas é *Halobacterium salinarum* e é usada como modelo em vários estudos de archaea (Gupta et al., 2015). Os gêneros *Natribaculum*, *Halosiccatus*, *Halocalculus* e *Halovarius* ainda não foram categorizados de acordo com os marcadores filogenéticos (Amoozegar et al., 2017). Na Tabela 2 são descritos a ordem, família e principais gêneros da classe Halobacteria atualmente conhecidos.

Tabela 2: Principais gêneros pertencentes à classe Halobacteria.

Classe:	Ordem	Família	Gênero
Halobacteria	Halobacteriales	Halobacteriaceae	<i>Halobacterium</i>
		Haloarcuaceae	<i>Haloarcula</i>
		Halococcaceae	<i>Halococcus</i>
	Haloferacales	Haloferacaceae	<i>Haloferax</i>
		Halorubraceae	<i>Halorubrum</i>
	Natrialbales	Natrialbaceae	<i>Natrialba</i>

Fonte: Adaptado: Gupta et al. (2015) e Euzéby (2021).

Os halófilos extremos são aqueles adaptados às altas concentrações de sal, denominados halófilos obrigatórios, pois só se desenvolve em elevadas concentrações de sal. Esses organismos requerem concentrações de no mínimo 1,5 Mmol.L⁻¹ (9%), mas em concentrações de 2 a 4 Mmol.L⁻¹ de NaCl (12-23%) são valores ótimos para seu crescimento, entretanto algumas espécies são capazes de crescer em 5,5 Mmol.L⁻¹ de NaCl (Madigan et al., 2016).

A desidratação e o estresse osmótico são os principais desafios para microrganismos halófilos extremos, entretanto sua adaptação ocorre pelas proteínas permanentemente expostas à baixa atividade de água e com condições iônicas extremas. Os halófilos extremos têm uma elevada concentração intracelular de sais (KCl), tão alta quanto a concentração de NaCl no seu habitat, tal fato previne a desidrataação e mantém o equilíbrio osmótico ao seu redor. Assim, as adaptações bioquímicas das proteínas da membrana dos halófilos extremos são adaptadas para suportar altas concentrações salina, influenciando diretamente os mecanismos de resistência a diferentes efeitos deletérios encontrado nesses ambientes salinos (Oren, 2014).

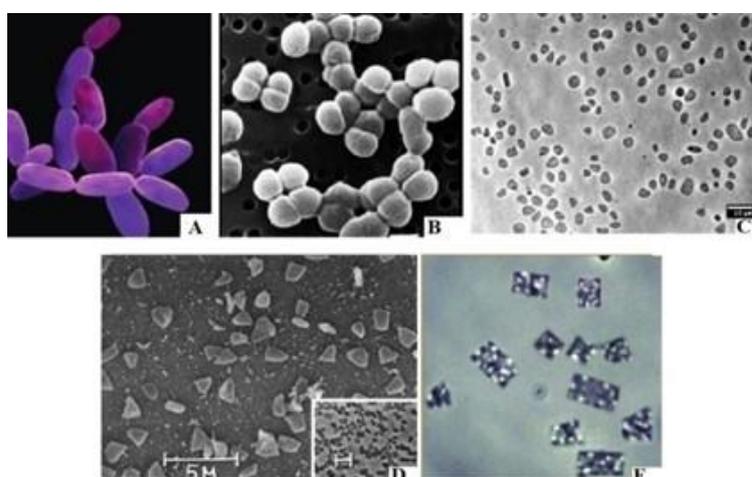
A elevada concentração de NaCl e sais de magnésio é muito importante para desenvolvimento e manutenção celular. Quando ocorre a redução nas concentrações menor que 2 mol L^{-1} ocorre o processo de lise celular que é a destruição ou dissolução da célula por ruptura da membrana plasmática. Dessa forma, as altas concentrações intracelulares de K^+ são mantidas pela célula (4 mol L^{-1}) o qual é análogo à concentração de Na^+ que exerce uma função importante na manutenção do equilíbrio osmótico. Nesses organismos as proteínas e ribossomos são estabilizados pelo bombeamento de K^+ do meio extracelular para o citoplasma, diferentemente do que ocorrem em organismos não halófilos por não exigir K^+ para estabilizar o ribossomo, e possivelmente ocorrer à agregação de proteínas, precipitação e desnaturação quando submetidos a altas condições salinas (Klein et al., 2005; Falb et al., 2008; Madigan et al., 2016).

Haloarchaea exibe enorme diversidade em termos de sua morfologia, fisiologia e outras características, são relatados como bastonetes no gênero *Halobacterium*, cocos em *Halococcus*, discos achatados no *Haloferax* e outras formas que variam de triângulos achatados em *Haloarcula* a quadrados em *Haloquadratum* e *Natronorubrum*. Seu habitat pode variar de alcalifílicos a acidofílicos e ou psicrotolerantes e eles podem ser móveis ou não móveis, e ser gram-negativos ou gram-positivos. Metabolicamente são, em sua maioria, aeróbios obrigatórios e quimioheterotróficos oxidando compostos como ácidos carboxílicos, açúcares, álcoois e aminoácidos, mas existem espécies autotróficas fotossintéticos providos de bacteriorodopsina, uma proteína da membrana pigmentada, que age como uma bomba de prótons acionada pela luz como a espécie *Halobacterium salinarum* (Oesterhelt e Krippahl, 1983; Grant et al., 2001; Oren, 2002).

Em relação à temperatura ótima de crescimento diversos autores como Lee (2013), Cui et al. (2017) e Sahli et al. (2020) relatam a temperatura de 37 a 42 °C, podendo variar de 20 a 56 °C em algumas espécies segundo Amoozegar et al. (2017).

A parede celular das haloarchaea é constituída por subunidades de glicoproteínas, em vez de peptidoglicano que é característico das bactérias, entretanto alguns organismos podem ter parede celulares quimicamente constituída por polissacarídeos complexos ou por unidades repetidas de L-glutamina e por essas diferenças podem exibir coloração gram-negativa (a maioria), mas essa coloração é variável em algumas espécies (Grant et al., 2001; Oren, 2006; Guan et al., 2012). A Figura 5 apresenta a microscopia de algumas espécies de Haloarchaea.

Figura 5: Micrografia de Haloarchaea: (A) *Halobacterium salinarum*, (B) *Halococcus*, (C) *Haloferax*, (D) *Haloarcula* e (E) *Haloquadratum walsbii*.



Fonte: (A) Disponível em: <<https://sites.google.com/site/groupaprokaryoticdiversity/home/halobacterium-salinarum>>. Acesso em 02 ago. 2021. (B) Namwong et al., (2007), (C) Disponível em: <<https://alchetron.com/Haloferax>>. Acesso em 02 ago. 2021, (D) Oren et al., (1999), (E) Disponível em <<https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Haloquadra>>. Acesso em 02 ago. 2021.

Há mais de 100 anos os membros dessa classe foram identificados, pois habitam em ambientes aquáticos, e em alguns alimentos salgados de origem animal (Figura 6), e com resultado da colonização apresentam coloração que pode variar entre vermelho, rosa e roxa (Capes et al., 2012).

Figura 6: Exemplos naturais de ambientes hipersalinos colonizados por haloarchaeas.



Fonte: (A) Disponível em: <<https://rotasdeviagem.com.br/descubra-o-lago-hillier-uma-surpresa-da-natureza-no-oeste-da-australia/>>. Acesso em 02 ago. 2021. (B) Disponível em: <<https://glamurama.uol.com.br/sete-impressionantes-lagos-cor-de-rosa-que-parecem-coisa-de-outro-planeta/>>. Acesso em 02 ago. 2021, (C) Disponível em <https://www.tripadvisor.com.br/ShowUserReviews-g187527-d3500008-r317182394-Las_Salinas_de_Torre Vieja-Torre Vieja_Costa_Blanca_Province_of_Alicante_Valencian.html>. Acesso em 02 ago. 2021.

A coloração vermelha dos lagos hipersalinos (Figura 6) como o lago Hillier na Austrália (A), Masazirgol no Azerbaijão (B), Salinas de Torre Vieja na Espanha (C) é devido à abundância de pigmentos carotenóides encontrados nas membranas celulares das halobactérias (Oren, 1994).

Diversos pigmentos estão presentes em plantas, algas e microrganismos, como os carotenoides (pigmentos de cores amarela, laranja e vermelha), que são obtidos por via biossintética dos terpenos e diferenciados de acordo com o número de estruturas de carbono (C30, C40 e C50). Nas haloarchaea esses pigmentos estão presentes sendo expressas na cor rosa ou vermelho por razão da alta produção de carotenóides C50, com bacterioruberina (BR) e seus precursores - monoanidrobacterioruberina (MABR), bisanidrobacterioruberina (BABR) e 2-isopentenil-3,4-desidrorodopsina (IDR) (Borowitzka, 2010; Tobias e Arnold, 2006; Yatsunami et al., 2014).

Os carotenoides são produzidos como metabólico secundário pela haloarchaea e apresenta função biológica de reforço e rigidez a membrana celular, proteção ao DNA contra alta incidência de luz (protetores contra os danos da radiação ultravioleta) e ainda diminui a permeabilidade à água nas células desses organismos (Hwang et al., 2021).

Ghanmi et al. (2020), relatam que as haloarchaeas produzem compostos antimicrobianos, entre os quais peptídeos antimicrobianos chamados halocinas.

Em comparação com outros microrganismos, as haloarchaea representam a menor parte dos estudos, são pouco difundidas, mas podem trazer avanços industriais favoráveis. Deste modo a partir da década de 1990 diversos estudiosos centralizam suas pesquisas na produção de carotenoides, degradação de hidrocarbonetos, potencial na produção de enzimas hidrolíticas, potencial em processos de biorremediação, estudo da biodiversidade das comunidades microbianas aquáticas e de solo, e sua relação como contaminante em produtos cárneos salgados e suas medidas de controle (Moschetti et al., 2006; Lee, 2013; Krzmarzick et al., 2018).

MEDIDAS DE CONTROLE

A deterioração de produtos alimentícios pode ocorrer por alterações físicas, químicas e microbiológicas. As alterações microbiológicas são aqueles onde microrganismos colonizam o alimento e alteram suas características, texturas, aromas, sabor, podendo ocasionar patologia aos humanos (Franco e Landgraf, 2008).

A conservação de carne por salga originou-se desde os primórdios e vem sendo utilizada até hoje principalmente em produtos regionais brasileiros como o jerked Beef, a carne

de sol e o charque juntamente com alternativas para aumentar a vida de prateleira destes produtos (Ishihara e Madruga, 2013).

Os métodos físicos (calor, frio, embalagens com atmosfera modificada - EAM) e químicos (aditivos alimentares) de preservação têm como finalidade principal a inibição da deterioração microbiana como também minimizar as alterações sensoriais e química (Zhou et al., 2010).

Mantilla et al. (2010), reportam que tradicionalmente esses produtos além de contar com barreiras como salga e dessecação utilizam também a EAM como a embalagem a vácuo que reduz o nível de O₂ para menos de 1%, impedindo o crescimento de aeróbios deteriorantes como as archaea halófilas. Entretanto um produto embalado a vácuo que porventura sofra alguma ação mecânica ocasionando perfurações na embalagem, a proliferação microbiana poderá ocorrer pelo aumento das concentrações de O₂.

Assim, apesar das técnicas de conservação disponíveis utilizadas, a segurança microbiológica ainda é uma preocupação, causando assim um incentivo à busca de novas técnicas, processos e substâncias (como aditivos) para garantir a inocuidade (Hayouni et al., 2008).

Para charque, além das barreiras de salga, dessecação e embalagem a vácuo uma nova barreira ficou autorizado que é a utilização de aditivos intencionais com acidulante pela sua Instrução Normativa N° 92, de 18 de setembro de 2020, que até então era proibido o uso. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 272, de 14 de março de 2019 para industrializados secos são permitidos o uso de acidulantes: ácido láctico, ácido cítrico e glucono-delta-lactona tendo como limite máximo *quantum satis*.

O ácido láctico, é um produto natural de uso industrial obtido como produto resultante do metabolismo de microrganismos, um ácido orgânico fraco de ação antimicrobiana (reduzir o pH do meio), antioxidante que aumenta a vida de prateleira por proporcionar estabilidade sensorial dos produtos (Campêlo, 2016). O ácido cítrico é outro ácido orgânico fraco encontrado nos citrinos principalmente no limão e laranja, sua acidez é devido à presença de três grupos carboxílicos que em soluções perdem prótons formando-se o íon citrato, considerado um bom controlador de pH em soluções ácidas. Para uso industrial sua obtenção se dá por fermentação fúngica aeróbica (Freiberger, 2016). O acidulante glucono-delta-lactona (GDL) é obtido em condições naturais a partir do mel, uva e outras frutas de sabor adocicado encontrado em estado sólido cristalino que em contato com a água converte-se em ácido glucônico promovendo a redução do pH, sendo bastante utilizado em produtos cárneos (Soltoft-Jensen e Hansen, 2005).

Assim o estudo da utilização de ácidos orgânicos em produtos cárneos salgados, como antimicrobianos veem sendo largamente pesquisado com o intuito de inibir a presença de deteriorantes e patogênicos é conseqüentemente aumentar a vida de prateleira dos produtos (Lin et al., 2018).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos envolvendo archaeas halófilas vem ocorrendo principalmente nas áreas ecológica e ambiental, mas novas espécies estão sendo descoberta a partir de alimentos salgados como também a recente descoberta da sua inter-relação com a vida humana, entretanto os relatos das relações entre archaea em alimentos e humanos ainda são escassos devido à falta de interesse dos pesquisadores no isolamento desses organismos peculiares. Técnicas de cultivo para archaeas halofílicas devem ser mais desenvolvidas principalmente por métodos dependentes de cultura pura em vez de descobertas de DNA através de métodos independentes da cultura, pois o sucesso em cultivo acarretara no melhor entendimento para compreensão dos mecanismos de adaptação desses microrganismos, além de utiliza-las para produção de enzimas, substâncias para a indústria de alimentos, e conhecimento nas medidas de controles para inibir a contaminação em produtos cárneos salgados desde a elaboração até o produto final.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiura, F. S., Carvalho, M. R. B., Viegas, E. M. M., Kirschnik, P. G., Lima, T. M. A. Conservação de filés de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) em salga seca e salga úmida. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, p. 1531-1537, 2008.
- Akpolat, C., Ventosa, A., Birbir, M., Sanchez-Porro, C., Caglayan, P. Molecular Identification of Moderately Halophilic Bacteria and Extremely Halophilic Archaea Isolated from Salted Sheep Skins Containing Red and Yellow Discolorations. *Journal of the American Leather Chemists Association*, v. 110, no. 07, p. 211–226, 2015.
- Amoozegar, M. A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H., Ventosa, A. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, v. 163, no. 5, p. 623–645, 2017. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000463>.
- Aykin-Dinçer, E., Erbaş, M. Drying kinetics, adsorption isotherms and quality characteristics of vacuum-dried beef slices with different salt contents. *Meat Science*, v. 145, p. 114–120, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.007>
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D., Pace, N. R. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, no. 17, p. 9188–9193, 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9188>

Borowitzka, M. A. Carotenoid Production Using Microorganisms. *Single Cell Oils: Microbial and Algal Oils: Second Edition*, p. 225–240, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-73-8.50015-3>

Brasil. (2020). Instrução Normativa Nº 92, de 18 de setembro de 2020. Dispõe Sobre a Identidade e os Requisitos de Qualidade do Charque, da Carne Salgada Curada Dessecada, do Miúdo Salgado Dessecado e do Miúdo Salgado Curado Dessecado. Disponível em < <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-92-de-18-de-setembro-de-2020-278692460>>. Acesso em 03 ago. 2021.

Brochier-Armanet, C, Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 2008 6:3, v. 6, no. 3, p. 245–252, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1852>

Brochier-Armanet, C, Gribaldo, S., Forterre, P. Spotlight on the Thaumarchaeota. *The ISME Journal* 2012 6:2, v. 6, no. 2, p. 227–230, 2011. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.145>

Brochier-Armanet, Celine, Forterre, P., Gribaldo, S. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Current Opinion in Microbiology*, v. 14, no. 3, p. 274–281, 2011. <https://doi.org/10.1016/J.MIB.2011.04.015>

Campêlo, M. C. S Uso de conservadores naturais na elaboração de carne de sol com teores reduzidos de cloreto de sódio. 2016. 71 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró.

Cui, H. L., Lü, Z. Z., Li, Y., & Zhou, Y. *Salinirussus salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 67, n. 9, p. 3622–3626, 2017. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002182>

De Carvalho, C. C. C. R.; Fernandes, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment. *Marine Drugs*, v. 8, n. 3, p. 705–727, 2010. <https://doi.org/10.3390/md8030705>

DeLong, E. F. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, no. 12, p. 5685–5689, 1992. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.12.5685>

Elkins, J. G., Podar, M., Graham, D. E., Makarova, K. S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B. P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E. v., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M., Stetter, K. O. A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, no. 23, p. 8102–8107, 2008. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0801980105>

Falb, M., Müller, K., Königsmaier, L., Oberwinkler, T., Horn, P., von Gronau, S., Gonzalez, O., Pfeiffer, F., Bornberg-Bauer, E., Oesterhelt, D Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* 2008 12:2, v. 12, no. 2, p. 177–196, 2008. <https://doi.org/10.1007/S00792-008-0138-X>

Franco, B. D. G.; Landgraf, M. *Microbiologia de alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008.

Freiberger, R. C. D. P. Utilização de ácidos orgânicos como conservantes em linguças curadas cozidas embaladas a vácuo. Ano de obtenção: 2016. 77 p. Dissertação (mestrado Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Garcia, C. E. R., Bolognesi, V. J., Shimokomaki, M. Aplicações tecnológicas e alternativas para redução do cloreto de sódio em produtos cárneos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 31, no. 1, p. 139–150, 2013. <https://doi.org/10.5380/CEP.V31I1.32715>

Ghanmi, F., Carré-Mlouka, A., Zarai, Z., Mejdoub, H., Peduzzi, J., Maalej, S., Rebuffat, S. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* ETD5 from the solar saltern of Sfax (Tunisia) produces multiple halocins. *Research in Microbiology*, v. 171, no. 2, p. 80–90, 2020. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2019.09.003>

Grant, W. D. Class III. Halobacteria class nov. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v. 1, p. 294-301, 2001

Guan, Z., Naparstek, S., Calo, D., & Eichler, J. Protein glycosylation as an adaptive response in Archaea: growth at different salt concentrations leads to alterations in *Haloferax volcanii* S-layer glycoprotein N-glycosylation. *Environmental microbiology*, v. 14, n. 3, p. 743-753, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02625.x>

Gupta, R. S., Naushad, S., Baker, S. Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class Halobacteria and its two major clades: a proposal for division of the class Halobacteria into an emended order Halobacteriales and two new orders, Haloferacales ord. nov. and Natrialbales ord. nov., containing the novel families Haloferacaceae fam. nov. and Natrialbaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 65, p. 1050–1069, 2015. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.070136-0>

Hayouni, E. A., Chraief, I., Abedrabba, M., Bouix, M., Leveau, J. Y., Mohammed, H., Hamdi, M. Tunisian *Salvia officinalis* L. and *Schinus molle* L. essential oils: Their chemical compositions and their preservative effects against *Salmonella* inoculated in minced beef meat. *International Journal of Food Microbiology*, v. 125, no. 3, p. 242–251, 2008. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2008.04.005>

Hohn, M. J., Hedlund, B. P., Huber, H. Detection of 16S rDNA Sequences Representing the Novel Phylum “Nanoarchaeota”: Indication for a Wide Distribution in High Temperature Biotopes. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 25, no. 4, p. 551–554, 2002. <https://doi.org/10.1078/07232020260517698>

Hwang, C. Y., Cho, E.-S., Yoon, D. J., Seo, M.-J. (*Halobellus ruber* sp. nov., a deep red-pigmented extremely halophilic archaeon isolated from a Korean solar saltern. *Antonie van Leeuwenhoek* 2021 114:7, v. 114, no. 7, p. 997–1011, 2021. <https://doi.org/10.1007/S10482-021-01571-1>

Ishihara, Y., Agrárias, M. M.-S. C., Londrina, Indicadores de maciez em carnes salgadas e dessecadas: uma revisão Tenderness indicators in salted and dried meat: a review. *researchgate.net*, v. 34, no. 2, p. 3721–3737, 2013. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3721>

- Klein, C., Garcia-Rizo, C., Bisle, B., Scheffer, B., Zischka, H., Pfeiffer, F., Siedler, F., Oesterhelt, D. The membrane proteome of *Halobacterium salinarum*. *PROTEOMICS*, v. 5, no. 1, p. 180–197, 2005. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200400943>
- Krzmarzick, M. J., Taylor, D. K., Fu, X., McCutchan, A. L. (Diversity and niche of archaea in bioremediation. *Archaea*, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3194108>
- Lee, H.-S. Diversity of Halophilic Archaea in Fermented Foods and Human Intestines and Their Application. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, no. 12, p. 1645–1653, 2013. <https://doi.org/10.4014/JMB.1308.08015>
- Lin, L., Hu, J. Y., Wu, Y., Chen, M., Ou, J., Yan, W. L. Assessment of the inhibitory effects of sodium nitrite, nisin, potassium sorbate, and sodium lactate on *Staphylococcus aureus* growth and staphylococcal enterotoxin A production in cooked pork sausage using a predictive growth model. *Food Science and Human Wellness*, v. 7, no. 1, p. 83–90, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.FSHW.2017.12.003>
- Lorentzen, G., Wesmajervi Breiland, M. S., Østli, J., Wang-Andersen, J., Olsen, R. L. Growth of halophilic microorganisms and histamine content in dried salt-cured cod (*Gadus morhua* L.) stored at elevated temperature. *LWT - Food Science and Technology*, v. 60, no. 1, p. 598–602, 2015. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.08.035>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., Stahl, D. A. *Microbiologia de Brock: Artmed*. 2016
- Mantilla, S. P. S., Mano, S. B., de Carvalho Vital, H., & Franco, R. M. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v. 8, n. 4, p. 437-448, 2010. <http://dx.doi.org/10.7213/cienciaanimal.v8i4.11000>
- Moschetti, G., Aponte, M., Blaiotta, G., Casaburi, A., Chiurazzi, M., Ventorino, V., Villani, F. Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. *Annals of Microbiology* 2006 56:2, v. 56, no. 2, p. 119–127, 2006. <https://doi.org/10.1007/BF03174992>
- Munson-McGee, J. H., Field, E. K., Bateson, M., Rooney, C., Stepanauskas, R., Young, M. J. Nanoarchaeota, their Sulfolobales Host, and Nanoarchaeota virus distribution across Yellowstone National Park hot springs. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, no. 22, p. 7860–7868, 2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.01539-15>
- Nunes, M. L., Pedro, S. Tecnologias tradicionais: Salga do pescado. Gonçalves et al. *Tecnologia do pescado: Ciência, tecnologia, inovação e legislação*. São Paulo: Atheneu, p. 156-165, 2011.
- Oesterhelt, D., & Krippahl, G. Phototrophic growth of halobacteria and its use for isolation of photosynthetically-deficient mutants. In: *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*. Elsevier Masson, 1983. p. 137-150. [https://doi.org/10.1016/S0769-2609\(83\)80101-X](https://doi.org/10.1016/S0769-2609(83)80101-X)
- Ordoñez, J. A., Rodrigues, M. I. C., Alvarez, L. F., Sanz, M. L. G., MIGUILLON, G. *Componentes dos Alimentos e Processos-Tecnologia de Alimento*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

- Oren, A. (2014). Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles* 2014 18:5, v. 18, no. 5, p. 825–834, 2014. <https://doi.org/10.1007/S00792-014-0654-9>
- Oren, A. The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 13, no. 4, p. 415–439, 1994. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.1994.TB00060.X>
- Paixão G. C. et al. *Desvendando o mundo invisível da microbiologia – Fortaleza: EdUECE*, 2015.
- Petit, T., Caro, Y., Petit, A. S., Santchurn, S. J., Collignan, A. Physicochemical and microbiological characteristics of biltong, a traditional salted dried meat of South Africa. *Meat Science*, v. 96, no. 3, p. 1313–1317, 2014. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2013.11.003>
- Picchi, V. *História, ciência e tecnologia da carne bovina*. Jundiaí: Paco Editorial, 2015.
- Pires, E. C. C. Riqueza do domínio Archaea no solo do bioma Cerrado. Ano de obtenção: 2012. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biologia molecular) - Universidade de Brasília.
- Quadri, I., Hassani, I. I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H., Jebbar, M. Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological Research*, v. 186–187, p. 119–131, 2016. <https://doi.org/10.1016/J.MICRES.2016.04.003>
- Rebouças, L. de O. S., Figueiredo, J. P. do V., Alves, V. C. F., Campêlo, M. C. da S., Oliveira, P. V. C. de, Souza, J. T., Firmino, S. S., Pereira, G. da S., Silva, J. B. A. da, Lima, P. de O. Diferentes processos de salga na qualidade de filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*). *Research, Society and Development*, v. 9, no. 10, p. e1029108251, 2020. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8251>
- Rios-Mera, J. D., Selani, M. M., Patinho, I., Saldaña, E., Contreras-Castillo, C. J. (Modification of NaCl structure as a sodium reduction strategy in meat products: An overview. *Meat Science*, v. 174, p. 108417, 2021. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2020.108417>
- Sahli, K., Gomri, M. A., Esclapez, J., Gómez-Villegas, P., Ghennai, O., Bonete, M. J., Kharroub, K. Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. *Journal of basic microbiology*, v. 60, n. 7, p. 624-638, 2020. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000083>
- Silva, M., Solidônio, E., ... M. V.-S., 2013, undefined. Efeito da irradiação gama na redução da carga microbiana em Jerked Beef. *Scientia Plena*, v. 9, n. 8, 2013.
- Søltoft-Jensen, J., Hansen, F. New Chemical and Biochemical Hurdles. *Emerging Technologies for Food Processing*, p. 387–416, 2005. <https://doi.org/10.1016/B978-012676757-5/50017-7>
- Tobias, A. V., Arnold, F. H. (Biosynthesis of novel carotenoid families based on unnatural carbon backbones: A model for diversification of natural product pathways. *Biochimica et*

Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1761, no. 2, p. 235–246, 2006. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2006.01.003>

Tortora, G., Case, C., Funke, B. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed, 2017

Vidal, V. A. S., Biachi, J. P., Paglarini, C. S., Pinton, M. B., Campagnol, P. C. B., Esmerino, E. A., da Cruz, A. G., Morgano, M. A., Pollonio, M. A. R. Reducing 50% sodium chloride in healthier jerked beef: An efficient design to ensure suitable stability, technological and sensory properties. *Meat Science*, v. 152, p. 49–57, 2019. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2019.02.005>

Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, no. 12, p. 4576–4579, 1990. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.12.4576>

Yatsunami, R., Ando, A., Yang, Y., Takaichi, S., Kohno, M., Matsumura, Y., Ikeda, H., Fukui, T., Nakasone, K., Fujita, N., Sekine, M., Takashina, T., Nakamura, S. Identification of carotenoids from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula japonica*. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 100, 2014. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00100>

Zhao, X., Sun, Y., Zhou, Y. Modeling the NaCl diffusion in beef during brining process. *Journal of Food Science*, v. 85, no. 9, p. 2852–2856, 2020. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15382>

Zhou, G. H., Xu, X. L., Liu, Y. Preservation technologies for fresh meat – A review. *Meat Science*, v. 86, no. 1, p. 119–128, 2010. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2010.04.033>

3 CAPÍTULO 2: ARTIGO 2²

Isolamento e caracterização de cepas halófilas a partir de charque

Isolation and characterization of halophilic strains from charque

Aislamiento y caracterización de cepas halófilas de charque

Resumo

Charque é um produto alimentício tipicamente brasileiro que consiste na adição de sal (cloreto de sódio - NaCl) em carne bovina. O sal é utilizado como conservante principal no preparo das carnes secas, entretanto certas espécies de microrganismos, conhecidos como halófilos, desenvolvem-se de maneira ideal na presença de altas concentrações de sal e conseqüentemente alimentos salgados podem conter halófilos e ocasionar alterações indesejáveis nesses produtos. Neste contexto esse estudo teve como objetivo isolar, caracterizar e avaliar os parâmetros no crescimento de cepas halófilas isoladas a partir de charque. Duas cepas halofílicas foram isoladas, sendo a cepa C11 com características morfológicas de cocos de colônia creme branca, enquanto a cepa V22 apresentou pleomorfica pigmentada de vermelha. Ambas as linhagens foram gram-negativas, catalase e oxidase positivas, com tempo ideal de crescimento após 15 dias de incubação a 37 °C. As cepas eram neutrófilas, crescendo apenas em pH 7,0 e após um planejamento experimental fatorial 2x3, para avaliar e otimizar o crescimento das cepas em diferentes concentrações de NaCl, MgCl₂ e extrato de levedura observou-se que para ambas as melhores condições de crescimentos das variáveis estudadas foram de 25 a 35 g L⁻¹ de MgCl₂, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, mas que em relação ao NaCl a cepa C11 não cresceu em meio contendo 300 (idealmente a 200) g L⁻¹ e a cepa V22 não cresceu em meio contendo 100 (idealmente a 300) g L⁻¹. Assim sugere-se que os isolados podem ser membros da família das *Halobacteriaceae* pelas características que apresentaram.

Palavras-chaves: Isolamento; Caracterização; Archaea; halófilos

Abstract

Charque is a typically Brazilian food product that consists of salt adding (sodium chloride - NaCl) to beef. The salt is used as the main preservative in the preparation of dried meat, however certain species of microorganisms, known as halophiles, develop in a way ideal in the presence of high concentrations of salt and consequently salty foods can contain halophiles and

² Artigo publicado: CHAGAS JUNIOR, A. F.; GUEDES, E. H. S.; SOARES, C. M. da S.; CUNHA, M. G.; SANTOS, A. L. dos; AGUIAR, A. O.; MARTINS, A. L. L. Isolation and characterization of halophilic strains from beef jerky. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. e21511326368, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i3.26368.

cause undesirable changes in these products. In this context, this study aims to isolate, characterize, and evaluate the parameters in the growth of halophilic strains isolated from charque. Two halophilic strains were isolated morphologically from white cream colony C11 strain, while V22 was red-pigmented pleomorphic. Both strains were gram-negative, catalase and oxidase positive, with ideal growth time after 15 days of incubation at 37 °C. The strains were neutrophils, growing only at pH 7.0 and after a 23 factorial experimental design, to evaluate and optimize the growth of the strains at different concentrations of NaCl, MgCl₂ and yeast extract, it was observed that for both the best growth conditions of the studied variables were 25 to 35 g L⁻¹ of MgCl₂, 5 g L⁻¹ of yeast extract, but in relation to NaCl strain C11 did not grow in medium containing 300 (ideally 200) g L⁻¹ and strain V22 did not grow in medium containing 100 (ideally 300) g L⁻¹. Thus, it is suggested that the isolates may be members of the Halobacteriaceae family due to their characteristics and knowledge of morphophysiological

Keywords: Isolation; Description; Archaea; halophiles

Resumen

El charque es un producto alimenticio típicamente brasileño que consiste en agregar sal (cloruro de sodio - NaCl) a la carne de res. La sal se utiliza como conservante principal en la preparación de carnes secas, sin embargo ciertas especies de microorganismos, conocidos como halófilos, se desarrollan idealmente en presencia de altas concentraciones de sal y consecuentemente los alimentos salados pueden contener halófilos y provocar cambios indeseables en estos productos. En este contexto, este estudio tuvo como objetivo aislar, caracterizar y evaluar los parámetros de crecimiento de cepas halófilas aisladas de charque. Se aislaron dos cepas halófilas, siendo la cepa C11 con características morfológicas de cocos colonia crema blanca, mientras que la cepa V22 presentó pleomorfa pigmentada en rojo. Ambas cepas fueron gram negativas, catalasa y oxidada positivas, con un tiempo de crecimiento ideal a los 15 días de incubación a 37 °C. Las cepas fueron neutrófilos, creciendo solo a pH 7.0 y luego de un diseño experimental factorial 2x3, para evaluar y optimizar el crecimiento de las cepas en diferentes concentraciones de NaCl, MgCl₂ y extracto de levadura, se observó que tanto para las mejores condiciones de crecimiento de las variables estudiadas fueron 25 a 35 g L⁻¹ de MgCl₂, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura, pero en relación al NaCl la cepa C11 no creció en medio que contenía 300 (idealmente 200) g L⁻¹ y la cepa V22 no creció. crecer en un medio que contenga 100 (idealmente 300) g L⁻¹. Así, se sugiere que los aislados pueden ser miembros de la familia Halobacteriaceae debido a sus características y el conocimiento de las características morfofisiológicas y bioquímicas

Keywords: Aislamiento; Descripción; Arqueas halófilos

1. Introdução

Charque é um produto alimentício tipicamente brasileiro que consiste na adição de cloreto de sódio (NaCl) em carne bonina (ou de outras espécies), submetida a processos de dessecação mediante as etapas de desossa, manteação, salga úmida e seca, remoção do excesso de sal, secagem e envase em embalagem a vácuo (Brasil 2020). É um produto de importância econômica em diversos países, pois desde a antiguidade a técnica de salga para produzir carnes secas já era utilizada para conservação de carnes *in natura* (Vidal et al., 2019).

O sal é utilizado como conservante principal no preparo das carnes secas, pode ser empregado de duas maneiras, pela imersão das carnes em salmouras (salga úmida) ou na formação de pilhas de carnes intercaladas por camadas de sal (salga seca), esses processos podem ocorrer em conjunto ou separadamente e ao fim proporciona desejáveis alterações sensoriais no produto (Picchi, 2015).

O NaCl utilizado na indústria alimentícia além de alterar o sabor, odor e texturas das carnes, inicialmente era utilizado para conservação, evitando a proliferação de microrganismos deteriorantes nos alimentos baseado no princípio de sua capacidade de reduzir atividade de água (Inguglia et al., 2017). Entretanto certas espécies de microrganismos, conhecidos como halófilos, requerem de maneira ideal altas concentrações de sal para se desenvolverem (Tortora et al., 2017).

Logo em todo mundo esses microrganismos habitam em locais hipersalinos, como lagos salgados, ambientes marinhos e salinas marinhas. Assim quando o sal oriundo dessas fontes é utilizado para salga de produtos de origem animal como carnes, peles e couro, os microrganismos halofílicos presentes no sal iniciam seu desenvolvimento (Enquahone et al., 2020).

Os halófilos podem necessitar de diferentes concentrações de sal, assim são classificados mediante a sua necessidade ótima quanto a concentração, os não halófilos requerem em menos de 1% (0,2 M) de NaCl, halotolerantes a 1-3% (0,2-0,5 M) de NaCl, halofílicos 3-15% (0,5-2,5 M) de NaCl e os halófilos extremos com crescimento ótimo a 15-30% (2,5-5,2 M) de NaCl. Os principais organismos relatados com afinidade a altas concentrações de sal são os procariotos pertencentes ao domínio bactéria e principalmente as archaeas (Amoozegar et al., 2017).

Madigan et al. (2016), relatam que apenas em meados da década de 1990 o domínio Archaea foi proposto por Woese et al. (1990), como organismos procarióticas semelhantes as

bactérias, mas com predominância de lipídios na membrana, diéteres de glicerol isoprenóide ou tetraéteres de diglicerol, sem a presença de peptidoglicano na parede celular e diferenciando-se quando comparadas aos domínios Bactéria e Eukarya em relação as características genéticas, moleculares, fisiológicas e estruturais.

Este domínio inclui um grupo excepcionalmente interessante e diverso de procariotos que não possuem peptidoglicano em suas paredes celulares, e a partir dos estudos envolvendo estes organismos ficou evidente as suas propriedades metabólicas extraordinárias pois realizam processos metabólicos incomuns e filogenia bastante particular, principalmente por serem microrganismos únicos a se desenvolver em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (Tortora et al., 2017).

Dentre o domínio archaea destaca-se a classe das Halobacteria ou Haloarchaea por ser considerado um dos maiores grupos dentro do domínio, e possui apenas uma única ordem, Halobacterial, uma única família, Halobacteriaceae (Gupta et al., 2015).

Como extremófilos as haloarchaea detém características admiráveis e atraentes, pois podem apresentar os limites da vida (com o aprofundamento dos mecanismos de sobrevivência em ambientes extremos e hostis) e ampliar a compreensão da biodiversidade no planeta no fornecimento de uma visão mais profunda do funcionamento das células além de das aplicações biotecnológicas industriais no fornecimento de biomoléculas altamente estáveis e ativos sob condições extremas (Quadri et al., 2016).

Por habitar em lago salinos, salinas e conseqüentemente alimentos salgados as haloarchaea pode ocasionar alterações indesejáveis em produtos cárneos salgados, a sua aparição pode ser caracterizada pelo surgimento de manchas avermelhadas ou rasadas além do forte odor de putrefação nos produtos (Moschetti et al., 2006). Enquahone et al. (2020), explicam que o aparecimento dessa coloração avermelhada em carnes e peles salgadas é característico das colônias desses organismos por produzirem esse tipo de pigmentação e por serem aeróbios e mesófilos seu crescimento se torna mais rápido principalmente em regiões tropicais, assim barreiras devem ser impostas para evitar a contaminação dos produtos.

As espécies halófilas podem variar principalmente quando se considera a diversidade de ambientes no qual se estuda tais organismos, então dependendo da fonte de sal usado para salga, o tipo de microrganismo halófilos podem ser diferente de um local para outro e o conhecimento acerca das espécies envolvidas na deterioração é essencial para elaborar estratégias de controle (Caglayan et al., 2017).

Atrelado aos fatos explanados acima, sugere-se assim que esses microrganismos detenham grande valor comercial seja pela sua ação deteriorante como também para produção

de moléculas estáveis de interesse biotecnológico, tornando-se assim a sua identificação e caracterização de grande importância para diversas áreas industriais como alimentícia, farmacêutica e para tratamento de efluentes. Até agora a maioria dos estudos foram concentrados no estudo de archaea halófilas isoladas de solo e lagos salinos (Singh e Singh, 2018, Sahli et al., 2020).

Neste contexto objetivou-se isolar, caracterizar e avaliar os parâmetros no crescimento de cepas halófilas a partir de charque.

2. Metodologia

2.1 Amostra

Para isolamento das cepas halófilas foi utilizado uma amostra de Charque – Carne bovina salgada dessecada em processo de deterioração visivelmente contaminada, gentilmente cedida pela Bello Charque Alimentos Eireli.

2.2 Isolamento e obtenção das cepas halófilas

As cepas foram isoladas seguindo a metodologia proposta de Sahli et al., (2020) com modificações utilizando a técnica de cultura de enriquecimento juntamente com a técnica de lavagem superficial da amostra.

Foi utilizado um meio para enriquecimento e cultivo (MEC) composto por 5 g L⁻¹ de peptona, 1 g L⁻¹ de extrato de levedura, 200 g L⁻¹ de NaCl, 30 g MgCl₂·6H₂O, 30 g MgSO₄·7H₂O, 0,5 g de CaCl₂·2H₂O, e 7 g de KCl, o pH foi ajustado para 7,2. Para meio sólido foi adicionado 17 g L⁻¹ de ágar.

Todos os experimentos foram realizados a temperatura de 37 °C, pois segundo os diversos relatos na literatura à temperatura ótima de crescimento para archaea halófila é em torno 37 a 42 °C como reportam Schneegurt (2012), Lee (2013), Amoozegar et al. (2017), Cui et al. (2017), Sahli et al. (2020) e Hwan, et al. (2021).

A amostra de charque contaminada (50 g) após lavada assepticamente com caldo MEC (50 mL) estéril foi incubada a 37 °C por 10 dias em frascos de erlenmeyer de 250 mL, após esse período alíquotas de 1 mL foram diluídas em solução de NaCl estéril a 20% e posteriormente 0,1 mL de cada diluição foram semeadas em ágar MEC e incubadas a 37 °C. Mediante o monitoramento do crescimento das colônias formadas, selecionou-se as cepas com base em suas diferentes características macroscópicas e realizou-se a técnica de esgotamento para obter culturas puras que posteriormente foram armazenadas em caldo MEC e armazenadas a -4 °C de modo a formar um banco de cultura.

Para obter e conhecer o melhor tempo de incubação dos isolados e preparo de pré-inóculo, uma alçada de cada cepa em cultura pura em meio sólido foi introduzido em caldo MEC com 20% de NaCl para obter a curva de crescimento através da densidade óptica (DO) por turbidez em espectrofotômetro por dias de incubação. O crescimento foi registrado a cada três dias com absorbância em 600 nm, e posteriormente considerou-se o maior valor de DO como máximo de crescimento. O experimento foi realizado em duplicata e as curvas de crescimento foram obtidas utilizando o Microsoft Excel 2010.

2.3 Identificação macroscópica, microscópica e características fisiológicas das cepas halófilas

Morfologia colonial, opacidade, margem, elevação, textura e pigmentação das colônias foram determinadas através das observações das características macroscópica das colônias em meio sólido após incubação a 37 °C por 15 dias.

Para identificação microscópica da morfologia celular utilizou-se a técnica de coloração Gram conforme descrito por Dussault (1955), no qual as lâminas secas ao ar foram fixadas e simultaneamente dessalinizadas em ácido acético a 2% por 5 min e em seguida, seco e corado, usando procedimentos padrão.

A produção de catalase foi determinada pela adição de uma solução de H₂O₂ a 3% às colônias em ágar (Grant et al., 2001). A presença de oxidase foi determinada observando a formação de uma cor violeta ao espalhar uma colônia em um pedaço de papel de filtro umedecido com 1% de dicloridrato de tetrametil-p-fenilenodiamina (Holding & Collee, 1971).

2.4 Efeitos de variáveis no crescimento das cepas halófilas

Para avaliar as características de crescimento dos isolados, conforme proposto por Oren et al. (1997), primeiramente neste estudo foi determinada o faixa ideal de pH para o crescimento das cepas, testando os isolados em diferentes faixas de pH (5, 7 e 9) em meio MEC. Alíquotas de pré-inóculos (100 µL) diluídas foram inoculados aos meios, e essas culturas foram incubadas 37 °C. O crescimento das culturas halófilas foram monitoradas por 15 dias, o valor de pH ótimo foi determinado após analisar a presença ou ausência da formação de colônias no meio.

Após essa determinação foi utilizada a metodologia de superfície de resposta com planejamento fatorial completo 2x3, obtendo onze ensaios de acordo com a metodologia proposta por Box e Draper (1987), visando avaliar a influência de diferentes concentrações de três variáveis: uma fonte de componentes orgânicos (extrato de levedura), uma fonte de

magnésio (MgCl_2) e salinidade (NaCl) (variáveis independentes) sobre a variável resposta, Unidade Formadoras de colônias (UFC.mL^{-1}) em meio sólido MEC (item 2.2).

As concentrações das variáveis foram determinadas a partir do trabalho de Schneegurt (2012), onde relata os diferentes meios e condições existentes para o crescimento de bactérias e archaea halofílicas e halotolerantes.

A tabela 3 apresenta o delineamento experimental, bem como as variáveis codificadas e reais.

Tabela 3: Delineamento experimental 2x3, para os ensaios de crescimento das cepas.

Ensaio	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3
1	+1	+1	+1	10	35	300
2	-1	-1	+1	1	10	300
3	+1	-1	+1	10	10	300
4	-1	+1	+1	1	35	300
5	+1	+1	-1	10	35	100
6	-1	+1	-1	1	35	100
7	+1	-1	-1	10	10	100
8	-1	-1	-1	1	10	100
9	0	0	0	5	25	200
10	0	0	0	5	25	200
11	0	0	0	5	25	200

X_1 = Extrato de levedura; X_2 = MgCl_2 e X_3 = NaCl , em g L^{-1} . Fonte: Autores

Na tabela 3 observa-se as diferentes concentrações das variáveis em estudos utilizadas dentre os 11 ensaios apresentadas em variáveis codificadas (-1, 0 e +1) e as variáveis com valores reais em g L^{-1} .

A priori as cepas halófilas foram crescidas em caldo MEC a $37\text{ }^\circ\text{C}$ até atingirem o crescimento ideal (determinada pela densidade óptica) conforme estabelecido pela curva de crescimento para a obtenção do pré-inóculo.

A contagem dos halófilos foi realizada por plaqueamento direto. Para isso, a partir do pré-inóculo foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} e posteriormente alíquotas de 0,1 mL de cada diluição foi espalhada, com auxílio de uma alça de drigalski, nas placas contendo o ágar MEC com as variações de extrato de leveduras MgCl_2 e NaCl . Os 11 ensaios foram realizados em triplicata e incubados a $37\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 dias e após realizou-se a contagem das colônias.

O modelo de otimização foi estimado incluindo o efeito de interação de acordo com o coeficiente de determinação (r^2), sendo este superior a 70%, permitindo inferir que o modelo explica alta porcentagem da variabilidade total. As análises dos resultados foram obtidas pelo *software* Statistica 7.0.

3. Resultados e Discussão

3.1 Determinação das características macroscópica, microscópica e fisiológicas das cepas halofílicas isoladas de charque

Os halófilos são organismos amantes do sal que habitam ambientes hipersalinos, microrganismos procarióticos e eucarióticos podem ter a capacidade de equilibrar a pressão osmótica do meio salino e resistir à desnaturação (Singh e Singh, 2018).

Produtos alimentícios salgados e fermentados geralmente contêm archaea halofílicas que se desenvolve em altas concentrações de NaCl e conseguem ocasionar a deterioração do produto mesmo em altas concentrações (Lorentzen et al., 2015; Lee, 2013; Moschetti et al., 2006).

A partir da amostra de charque em estado visível de deterioração (figura 7) foram obtidos após 15 dias de incubação dois isolados as cepas C11 e V22, através da sua pigmentação, tamanho e consistência. As cepas foram isoladas em cultura pura os quais foram submetidos a testes fisiológicos e morfológicos.

Figura 7: Amostras de charque contaminado por haloarchaea



Fonte: Autores

As cepas isoladas variaram em relação as suas características de coloniais. O isolado C11 apresentava uma pigmentação creme branca, colônias circulares translúcida, de margem espiral, com elevação convexa, enquanto a V22 apresentava uma pigmentação vermelha,

colônias puntiformes opaca, de margem inteira, com elevação plena, conforme ilustra a figura 8 apresentando as cepas isoladas.

Figura 8: Características morfológicas das cepas isoladas (A) e em cultura pura (B).



Fonte: Autor, (2021).

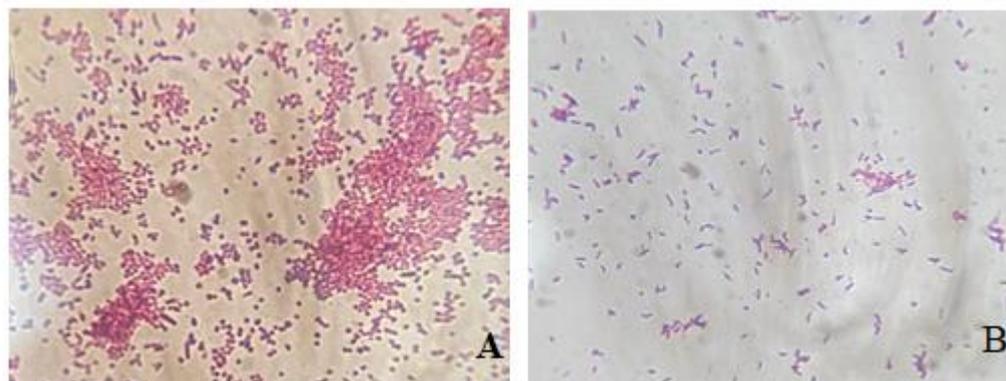
Em relação às características morfológicas celulares a cepa C11 apresentou forma coloide, enquanto a cepa V22 foram observadas células polimórficas (em forma de bastão ou cocos), ambas as cepas foram gram-negativas (figura 9) e foram catalase e oxidase positiva. A tabela 4 apresenta um resumo das características morfofisiológicas das cepas isoladas em meio a 20% de NaCl, essas propriedades, juntamente com a pigmentação da colônia e a necessidade de altas concentrações de sal, sugerem que os isolados podem ser membros da família das Halobacteriaceae (Hasan e Mohammadian, 2011).

Tabela 4: Características morfológicas e fisiológicas das cepas halofílicas

Características	C11	V22
Forma colonial	Circular	Puntiforme
Opacidade	Translúcida	Opaca
Margem	Espiral	Inteira
Elevação	Convexa	Plena
Textura	Cremosa	Mucosa
Pigmentação	Creme branco	Vermelha
Morfologia celular	Cocus	Polimórfica
Catalase	+	+
Oxidase	+	+
Gram	-	-

(-) Negativo; (+) Positivo. Fonte: Autores

Figura 9: Microscopia dos isolados após a coloração Gram das cepas C11 (A) e V22 (B).



Fonte: Autores

Singh e Singh (2018) relatam em seu estudo o isolamento de treze archaea halofílicas de salinas da Índia onde as colônias apresentavam diferentes tons de vermelho, Gram negativa, e crescimento em meio de cultivo na concentração saturante de NaCl (35%) o que é um indicativo de haloarchaea existente. Cui et al. (2017), encontraram archaea em forma de bastonete, Gram-negativos e colônias com pigmentação vermelha. Em geral archaeas halofílicas aparecem vermelhas devido à presença de carotenóides C₅₀ (bacterioruberinas) (Williams, 1989).

Okmen e Arslan (2019) isolaram archaeas do Lago Tuz (Turquia) e observaram que seus isolados apresentaram a pigmentação creme. Salgaonkar e Rodrigues (2019) obterão isolados a partir de sal iodado da Índia e visualizaram colônia com diferentes tons de pigmentação em amarelo, laranja e vermelho após 30 dias de incubação, assim podendo haver halófilos pigmentados ou não pigmentados. Portanto, Enquahone et al. (2020) elucidam que manchas vermelhas em carnes, peles de animais e outros produtos salgados, pode ser um indicativo de contaminação microbiana de halófilos no produto. Em geral a produção de pigmento de archaea halófilas em meio de cultura é conhecida por começar no final da fase de crescimento, em alguns casos começando após duas semanas.

Assim as condições de crescimento das haloarchaea afetam diretamente as características morfológicas das células, os organismos podem variar no tamanho das células entre 0,8 a 13 μm e podendo apresentar-se em células que geralmente são pleomórficas e às vezes formas alongadas, redondas, em disco e trapézio. Grande parte das espécies de *Haloferax* e *Haloarcula* são geralmente de natureza pleomórfica. No que se diz respeito aos estudos envolvendo Haloarchaea geralmente são consideradas gram-negativas, exceto para *halococos*

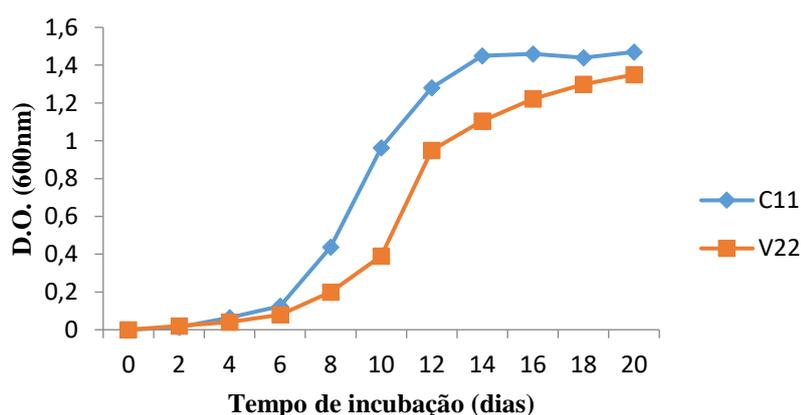
e os membros do gênero *Natronococcus* que também mostraram variedades entre gram positivas e negativas (Oren, 2014; Kumar e Tiwari, 2019).

Haloarchaea é geralmente isolado de diferentes ecossistemas, como lagos salinos (Birbir et al., 2007), Mar Morto (Oren e Shilo, 1981), lagos salinos do Irã (Hasan e Mohammadian, 2011), sal comercial (Minegishi et al., 2015). Novos tipos de archaea halófilas também vêm sendo descobertos a partir de alimentos como peixe fermentado e molhos de peixe que requerem uma grande quantidade de sal, e esses estudos estão sendo conduzidos principalmente na Coreia, Japão e países do sudeste asiático (Akolkar et al., 2010; Lee, 2013), no Brasil poucos são os relatos encontrados na literatura sobre o estudo de haloarchaea presente no charque, um produto tipicamente brasileiro.

Em relação às características morfológicas e fisiológicas das cepas isoladas no presente estudo, trabalhos como o de Savage et al. (2007), Singh e Singh (2018), Sahli et al. (2020) e Hwang et al. (2021) e dos outros autores citados acima corroboram com os resultados encontrados

Através da curva de crescimento dos isolado pode-se observar que ambas as cepas apresentaram um crescimento padrão como também foi importante para estabelecer o tempo ideal de incubação. Na figura 10 apresenta a curva de crescimento obtida por meio da mensuração de densidade óptica (DO) existente em 1 mL de meio ao longo de 20 dias.

Figura 10: Curvas de crescimento das cepas C11 e V22 em meio MEC 20% de NaCl em função dos valores obtidos pela densidade óptica.



Fonte: Autores (2021)

A partir dos dados da figura 10, observou-se que a cepa C11 apresenta um crescimento celular mais rápido em relação à cepa V22, o crescimento logarítmico (Fase log) da C11 foi a partir do sexto dia atingindo crescimento máximo por volta do décimo quinto dia (DO=1,46),

a cepa V22 apesar do tardio início da fase log, atingiu seu máximo crescimento por volta do décimo sexto dia de incubação (DO=1,105), após esse período, ambas as cepas aproximaram-se de sua fase estacionária, assim, considere-se o tempo de quinze dias para incubação dos isolados. A fase de declínio não foi observada já que a turbidimetria não é capaz de realizar discriminação entre as células vivas e as células mortas no meio de cultura (Tortora et al., 2017).

Esses resultados estão de acordo com os relatos na literatura pois segundo Schneegurt (2012), em geral as archaeas halófilas apresentam uma taxa de crescimento relativamente lenta quando comparadas as bactérias, assim devido à baixa taxa de crescimento de certas espécies, períodos de incubação de até dois meses podem ser necessários para obter o ideal resultados. Cui et al. (2017) utilizaram um mês de incubação para suas cepas halofílicas isoladas de uma salina solar da China, Sahli et al. (2020) relatam o crescimento de cepas halofílicas isoladas de solo salino da Argélia em 7 dias, enquanto Enquahone et al (2020) e Stan-Lotter (2002) utilizaram 15 dias como tempo ideal de incubação.

3.2. Determinação dos efeitos das variáveis no crescimento das cepas halófilas

A concentração de NaCl, MgCl₂, pH e temperatura são os principais fatores responsáveis pelo crescimento de haloarchaea em ambientes hipersalinos (Oren et al., 1997).

A partir dos testes realizados em diferentes faixas de pH observou-se a presença de crescimento de colônias de ambas as cepas em meio com pH 7 (neutrófilas), nas outras faixas testadas observou-se a ausência na formação de colônias após 15 dias de incubação.

Xu et al. (2019), avaliaram o crescimento de *Haloprofundus halophilus* sp. em meio líquido na faixa de pH entre 5,0-10,0 em intervalos de 0,5 unidades de pH e observou que a espécie conseguiu crescer entre pH 6,5-9,5, onde o pH ideal foi 7,0. Uma cepa halofílica de archaea, YGH44T, foi isolada da salina marinha de Yinggehai na província de Hainan, na China por Cui et al. (2017) e o crescimento ótimo foi obtido em pH 7,0 (faixa: pH 5,0-9,0). Hasan et al. (2011), também relatam o pH 7 como ótimo para crescimento de *Halobacterium salinarum* isolado de solução salina lagos no Irã.

Em seu estudo, Amoozegar et al. (2017), descrevem que as haloarchaeas podem crescer numa faixa de pH de 5,5 a 11. Haloarchaea são adaptados para sobreviver em uma faixa mais ampla de pH ligeiramente ácido, neutro a alcalino. A maioria dos membros isolados de diferentes habitats são neutrófilos ou alcalifílicos, enquanto haloarchaea acidófila são bastante limitadas (Kumar e Tiwari, 2019).

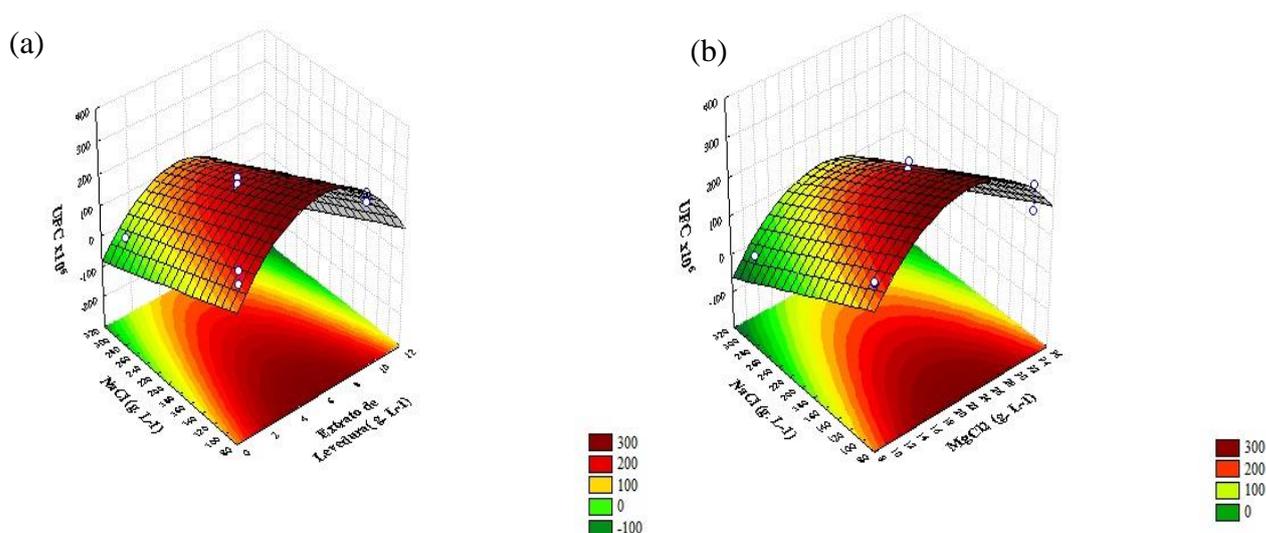
A faixa ideal de pH para o crescimento dos isolados no presente estudo corrobora com os relatos dos autores supracitados como também do ambiente no qual eles foram isolados, visto que o pH do charque é neutro variando numa faixa de 6,3 a 7,0 (Paim et al., 2017).

A partir do planejamento fatorial completo 2x3, que avaliou a influência de diferentes concentrações de uma fonte de componentes orgânicos (extrato de levedura), uma fonte de magnésio ($MgCl_2$) e salinidade ($NaCl$) (variáveis independentes) com o objetivo de otimizar as melhores condições de crescimento das cepas halofílicas. Pode-se observar que nos ensaios de número 1, 2, 3 e 4 no qual a concentração de $NaCl$ era de 300 g L^{-1} não houve crescimento da cepa C11, e nos ensaios 5, 6, 7 e 8 no qual a concentração de $NaCl$ era de 100 g L^{-1} não houve crescimento da cepa V22, assim nos ensaios subsequentes observou-se a partir dos resultados as melhores condições de crescimento dos isolados a partir dos ensaios positivos.

Para a otimização, os resultados sem significância foram descartados, resultando em modelos ajustados com o uso das variáveis codificadas (tabela 3). As adequações dos modelos podem ser compreendidas através do coeficiente de determinação (R^2) exemplificado entre 70 a 93% de variância entre as respostas.

As figuras 11 (a) e (b) apresentam respectivamente os efeitos das concentrações de $NaCl$ e extrato de levedura e os efeitos da concentração de $NaCl$ e $MgCl_2$ sobre o crescimento da cepa C11.

Figura 11: Superfície de resposta para (a) $NaCl$ e extrato de levedura em (g L^{-1}) e (b) $NaCl$ e $MgCl_2$ em (g L^{-1}) e em relação ao crescimento das cepas halófilas C11 ($\text{UFC mL}^{-1} \times 10^6$).

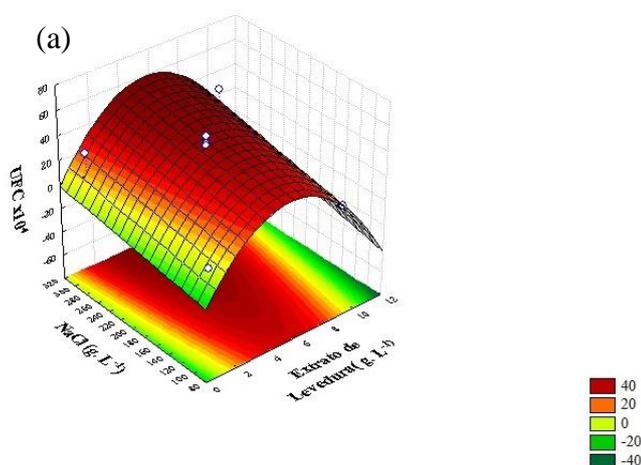


Sabe-se que para determinar o crescimento de archaeas halófilas parâmetros como salinidade, cloreto de magnésio e fonte de compostos orgânicos são imprescindíveis.

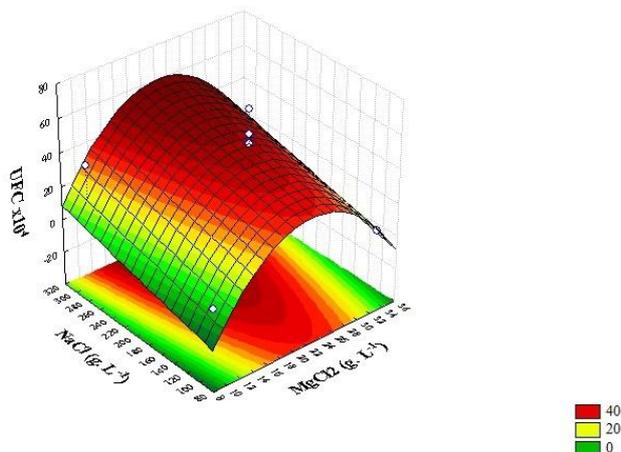
Os resultados apresentados nas figuras 11 (a) para crescimento da cepa C11 observa-se que a interação entre os parâmetros NaCl e extrato de levedura teve influência significativa para o crescimento, logo experimentos que contenham valores de 200 g L⁻¹ de NaCl e 5 g L⁻¹ de extrato de levedura são valores ideais para crescimento, pois observa-se que a região ótima para o atributo “crescimento” encontra-se situada próxima ao ponto central, entre 2,5 e 8 g L⁻¹, para a variável “extrato de levedura” e entre 100 e 150 g L⁻¹ para a variável “NaCl”. Na figura 11 (b) segundo o planejamento experimental, foi possível comprovar que o aumento do crescimento foi favorecido pelas concentrações medianas de NaCl e MgCl₂, ambas tiveram um efeito significativo, visto que a região ótima para crescimento foi entre 14 a 26 g L⁻¹ para MgCl₂ e 100 a 150 g L⁻¹ para NaCl, assim as concentrações do ponto centrais no experimento se tornaram valores ideais para crescimento. Nesse estudo não ocorreu interações significativas entre o extrato de levedura e MgCl₂. As superfícies apresentaram R² de 0,98 na figura 11(a) e na figura 11 (b) 0,95 demonstrando uma boa correlação dos dados.

As figuras 12 (a), (b) e (c) apresentam respectivamente os efeitos das concentrações de NaCl e extrato de levedura, efeitos da concentração de NaCl e MgCl₂ e efeitos da concentração MgCl₂ e extrato de levedura sobre o crescimento da cepa V22.

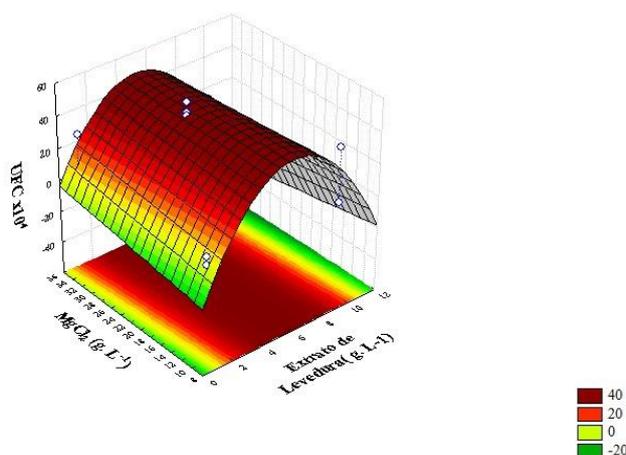
Figura 12: Superfície de resposta para (a) NaCl e extrato de levedura e (b) NaCl e MgCl₂ (g L⁻¹) e (c) MgCl₂ e extrato de levedura em relação ao crescimento das cepas halófilas V22 (UFC mL⁻¹ x 10⁴).



(b)



(c)



Observa-se a partir dos resultados que houve interações significativas entre todas as variáveis avaliadas para a cepa V22. Na figura 12 (a) observa-se que tanto o NaCl quanto o extrato de levedura foram variáveis significativas em resposta ao crescimento da cepa aos quais foram constatados valores entre 250 e 300 g L⁻¹ de NaCl e 5,5 g L⁻¹ de extrato de levedura como ideais para o crescimento. Outra interação significativa é observada na figura 12 (b) onde as variáveis NaCl e o MgCl₂ foram significativas assim como na figura 12 (c) que também houve significância entre as variáveis MgCl₂ e extrato de levedura, assim evidenciando que 35 g L⁻¹ de MgCl₂ seja ideal para o crescimento, e ao se observar e comparar as figuras 12(a) (b) e (c) observa-se que os valores significativos estão dentro dos mesmos valores em todos os gráficos de superfície de resposta. As superfícies apresentaram R² de 0,81 na figura 12(a), 0,73 na figura 12 (b) e 0,87 na figura 12 (c) demonstrando também uma boa correlação dos dados.

Halófilos são organismos que necessitam de altos níveis de NaCl, na literatura esses microrganismos necessitam inicialmente de no mínimo 10% de cloreto de sódio e alguns deles podem até sobreviver em cristais de sal. Os íons de sódio são essenciais para manter a

integridade da célula pois sigam-se a superfície externa da parede celular dos gêneros *Halobacterium*, assim quando submetidas a ambiente com baixas concentrações de Na^+ ocorre a lise celular. Esses organismos adaptaram-se a manter altas concentrações de outros solutos no seu citoplasma para manter a integridade do equilíbrio osmótico com mundo exterior (DaSarma e Arora, 2002; Oren, 2002).

Nesse estudo três diferentes concentrações de NaCl foram testadas sobre o crescimento dos isolados e através dos experimentos pode-se observar a habilidade da cepa C11 em crescer entre 100 e 200 g L^{-1} , e a cepa V22 em 200 e 300 g L^{-1} considerando-as assim de halofílicas extremas.

Sahli et al. (2020) relataram que todos seus isolados foram extremos halófilos e requerem pelo menos 15% de salinidade e cresceu de forma otimizada em 20-25%, enquanto Minegishi et al., (2015) relataram que *Halococcus agarilyticus* foi capaz de crescer com 24-30% NaCl (ótimo, 27%). Singh e Singh, (2018) relataram que a concentração ideal de NaCl para treze archaea halofílicas de salinas do oeste da Índia foi 20-25%. Esses resultados são semelhantes aos valores deste estudo.

Outro parâmetro analisado no experimento de otimização para crescimento foi o extrato de levedura, uma fonte de carbono mais popular em meios complexos para bactérias halotolerantes e archaea halofílicas e, essa fonte de compostos orgânicos geralmente é adicionada em baixas quantidades aos meios, porém indispensável por ser rica em vitaminas e outros fatores de crescimento que estimulam o crescimento microbiano (Schneegurt, 2012). Ponderando os resultados obtidos foi determinado que as cepas apresentassem melhor crescimento em 5 g L^{-1} . O estudo de Birbir et al. (2007), apoiam os dados deste estudo, onde os autores relatam que suas cepas halofílicas cresceram idealmente a concentração de 0,5%. As concentrações de extratos de leveduras variam dentre os autores onde as concentrações utilizadas vão desde 0,1% (Sahli et al., 2020; Minegishi et al., 2015), 0,5 % (Mullakhanbhai e Larsen, 1975; Rodriguez-Valera et al., 1980; Tomlinson e Hochstein, 1972) e até 1% (Singh e Singh, 2018) tais valores foram testados nos experimentos.

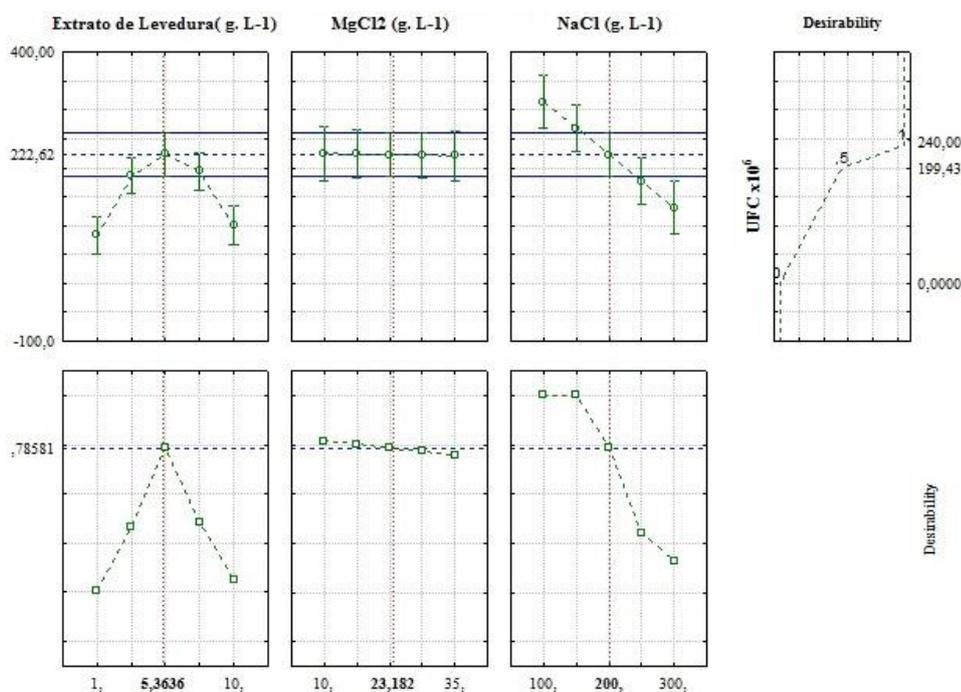
As necessidades de sais de Mg são requisitadas entre os microrganismos, é quando se trata de cepas halotolerantes e halofílicas suas necessidades de Mg^{2+} são bem maiores para seu crescimento, mas seu crescimento pode ser inibido por maiores concentrações de Mg^{2+} , esse cátion divalente mantém a morfologia celular estável. Para formulação de meios para haloarchaea utiliza-se concentrações de 2-5% de sais de Mg que podem ser como cloreto (mais popular) e sulfeto e nitrato de magnésio (Schneegurt, 2012). Na literatura as concentrações de 0,6-0,9 M para culturas halofílicas são relatadas (Okmen e Arslan, 2019), como mostrado, esses

estudos apoiam os resultados obtidos nos experimentos relatando o valor de 2,5 % como ótimo para o crescimento.

Em seu estudo Vidyasagar et al. (2007), determinaram a concentração ótima de $MgCl_2$ para crescimento e produção de protease onde como aumento da concentração do sal houve um aumento de crescimento e produção enzimática atingindo o máximo em 0,5 M, entretanto na concentração de 1 M e superiores inibiram o crescimento. O requerimento de $MgCl_2$ de *Halovenus aranensis* isolado do sal do lago Aran-Bidgol no Irã por Makhdoumi-Kakhki et al. (2012) para o crescimento foram determinados em meio contendo $MgCl_2$ em 0-1 M com intervalos de 0,05 M, respectivamente, o magnésio foi necessário para o crescimento dentro do intervalo 0,1-1 M e o ótimo crescimento ocorreu a 0,5 M.

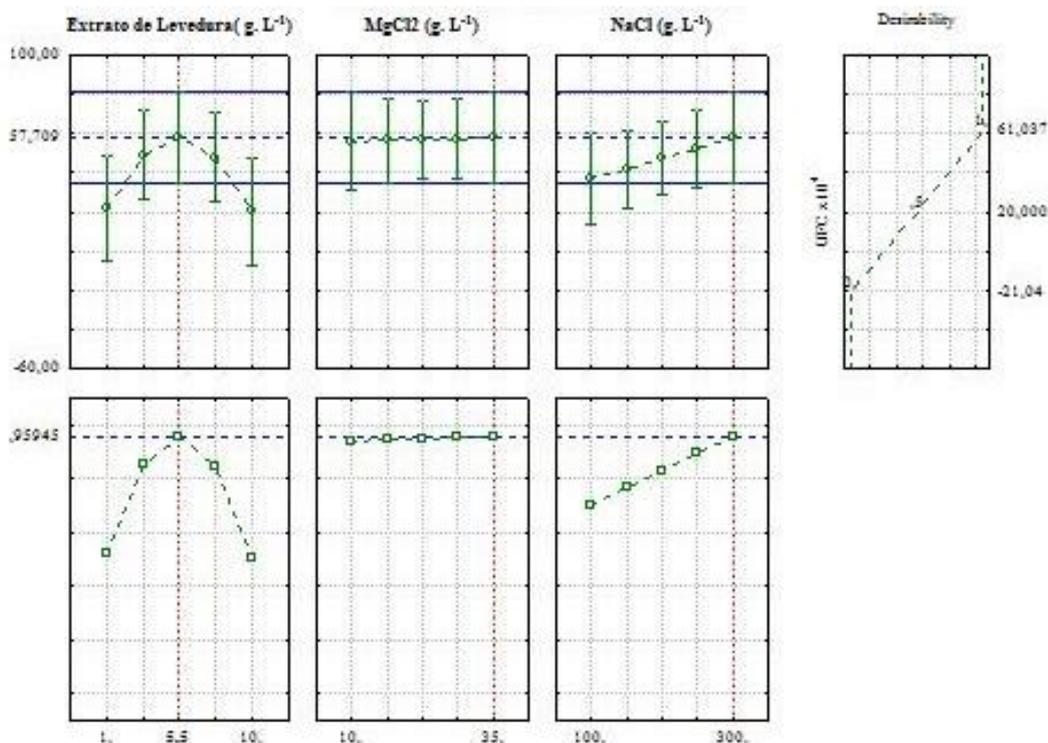
De modo geral os estudos da literatura são consistentes com os resultados encontrados nesses estudos, e pôr fim a partir das figuras 13 e 14 pode-se observar os resultados mediante a realização do teste de desejabilidade, na qual são apresentadas as especificações (mínima, ótima e máxima) referente aos resultados obtidos para os ensaios otimizados quanto as proporções de extrato de levedura, NaCl e $MgCl_2$ para a elaboração otimizada de meios de cultura para as cepas.

Figura 13: Perfil dos valores otimizados pelo teste de desejabilidade para potencial de extrato de levedura, NaCl e $MgCl_2$ no crescimentos da cepa C11.



Fonte: Autores

Figura 14: Perfil dos valores otimizados pelo teste de desejabilidade para potencial de extrato de levedura, NaCl e MgCl₂ no crescimentos da cepa V22.



Fonte: Autores

Deste modo, conforme as figuras 13 e 14, para a obtenção dos valores ótimos na desejabilidade, os melhores ajustes dos fatores são, 5,3 e 5,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 23,1 e 35 g L⁻¹ de MgCl₂ e 200 e 300 g L⁻¹ de NaCl para as cepas C11 e V22 respectivamente. Assim como descrito por Bianchin, Yamashita e Benassi (2017), os parâmetros ótimos descritos pelas desejabilidade, estão dispostos onde às linhas verticais em vermelho presentes nos gráficos correspondem aos valores ótimos dos parâmetros estudados, considerando assim os ensaios 9,10 e 11 para C11 e o ensaio 1 para V22.

4. Conclusão

Conclui-se assim que as duas cepas halofílicas obtidas a partir do charque em estado de deterioração sejam organismos pertencentes ao domínio Archaea da classe Halobacteria por apresentar características típicas como gram-negativas, catalase e oxidase negativa, morfologia celular em cocos (C11) e pleomorfica (V22), e por apresentaram uma taxa de crescimento relativamente lenta iniciando sua fase log após 6-8 dias de incubação. Ainda as linhagens foram neutrófilas e não houve crescimento em meio com pH 5 e 9.

A partir do planejamento pode-se estabelecer que as cepas sejam extremófilas crescendo idealmente a 200 a 300 g L⁻¹ (3,4 M) de NaCl e 25 a 35 g L⁻¹ de MgCl₂ e necessitando de 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, com base nos resultados do planejamento experimental deste estudo apoiaram a hipótese que as diferentes condições de cultivo podem influenciar o crescimento de archaea halofílicos.

O conhecimento das características morfofisiológicas e bioquímicas das cepas se torna-se necessária quando se busca estabelecer barreiras frente a proliferação e deterioração de produtos cárneos salgados por esses organismos. Embora o isolamento de archaea halofílicas de ambiente hipersalino em todo o mundo tenha recebido muita atenção durante as últimas décadas, poucos estudos foram realizados a partir do charque, pois essas investigações concentraram-se principalmente em lagos salinos.

Referências

- Akolkar, A. V., Durai, D., & Desai, A. J. (2010). Halobacterium sp. SP1 as starter culture for accelerating fish sauce fermentation. *Journal of applied microbiology*, 109(1), 44-53.
- Amoozegar, M. A., Siroosi, M., Atashgahi, S., Smidt, H., & Ventosa, A. (2017). Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. *Microbiology*, 163(5), 623-645.
- Bianchin, M., Yamashita, F., & Benassi, M. D. T. (2017). Microwave assisted saponification for diterpenes extraction in roasted arabica coffee. *QUIMICA NOVA*, 40(9), 1039-1044.
- Birbir, M., Calli, B., Mertoglu, B., Bardavid, R. E., Oren, A., Ogmen, M. N., & Ogan, A. (2007). Extremely halophilic Archaea from Tuz Lake, Turkey, and the adjacent Kaldirim and Kayacik salterns. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(3), 309-316.
- Box, G. E., & Draper, N. R. (1987). *Empirical model-building and response surfaces*. John Wiley & Sons.
- Brasil. (2020). Instrução Normativa N° 92, de 18 de setembro de 2020. Dispõe Sobre a Identidade e os Requisitos de Qualidade do Charque, da Carne Salgada Curada Dessecada, do Miúdo Salgado Dessecado e do Miúdo Salgado Curado Dessecado. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-92-de-18-de-setembro-de-2020-278692460>
- Caglayan, P., Birbir, M. E. R. A. L., Sanchez-Porro, C., & Ventosa, A. (2017). Screening of Industrially Important Enzymes Produced by Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Salted Sheep Skins of Diverse Origin. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 112(06), 207-216.
- Cui, H. L., Lü, Z. Z., Li, Y., & Zhou, Y. (2017). *Salinirussus salinus* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 67(9), 3622-3626.

- DaSarma, S., & Arora, P. (2002). Halophiles. *Encyclopedia of life sciences. London. Nature Publishing Group*, 8, 458-466.
- Dussault, H. P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of bacteriology*, 70(4), 484-485.
- Enquahone, S., van Marle, G., Gessesse, A., & Simachew, A. (2020). Molecular identification and evaluation of the impact of red heat damage causing halophilic microbes on salted hide and skin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 150, 104940.
- Grant, W. D. (2001). Class III. Halobacteria class nov. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1, 294-301.
- Gupta, R. S., Naushad, S., & Baker, S. (2015). Phylogenomic analyses and molecular signatures for the class Halobacteria and its two major clades: a proposal for division of the class Halobacteria into an emended order Halobacteriales and two new orders, Haloferacales ord. nov. and Natribales ord. nov., containing the novel families Haloferacaceae fam. nov. and Natribaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(Pt_3), 1050-1069.
- Hasan, S. M., & Mohammadian, J. (2011). Isolation and characterization of *Halobacterium salinarum* from saline lakes in Iran.
- Holding, A. J., & Collee, J. G. (1971). Chapter I Routine biochemical tests. In *Methods in microbiology* (Vol. 6, pp. 1-32). Academic Press.
- Hwang, C. Y., Cho, E. S., Yoon, D. J., & Seo, M. J. (2021). Halobellus ruber sp. nov., a deep red-pigmented extremely halophilic archaeon isolated from a Korean solar saltern. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1-15.
- Kumar, V., & Tiwari, S. K. (2019). Halocin diversity among Halophilic Archaea and their applications. In *Microbial diversity in ecosystem sustainability and biotechnological applications* (pp. 497-532). Springer, Singapore.
- Lee, H. S. (2013). Diversity of halophilic archaea in fermented foods and human intestines and their application. *Journal of microbiology and biotechnology*, 23(12), 1645-1653.
- Inguglia, E. S., Zhang, Z., Tiwari, B. K., Kerry, J. P., & Burgess, C. M. (2017). Salt reduction strategies in processed meat products—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 70-78.
- Lorentzen, G., Breiland, M. S. W., Østli, J., Wang-Andersen, J., & Olsen, R. L. (2015). Growth of halophilic microorganisms and histamine content in dried salt-cured cod (*Gadus morhua* L.) stored at elevated temperature. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 598-602.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2016). *Microbiologia de Brock-14ª Edição*. Artmed Editora.
- Makhdoumi-Kakhki, A., Amoozegar, M. A., & Ventosa, A. (2012). *Halovenus aranensis* gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aran-Bidgol salt lake. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_6), 1331-1336.

- Minegishi, H., Echigo, A., Shimane, Y., Kamekura, M., Itoh, T., Ohkuma, M., & Usami, R. (2015). *Halococcus agarilyticus* sp. nov., an agar-degrading haloarchaeon isolated from commercial salt. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(Pt_5), 1634-1639.
- Moschetti, G., Aponte, M., Blaiotta, G., Casaburi, A., Chiurazzi, M., Ventrino, V., & Villani, F. (2006). Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. *Annals of microbiology*, 56(2), 119-127.
- Mullakhanbhai, M. F., & Larsen, H. (1975). *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Archives of microbiology*, 104(1), 207-214.
- Okmen, G., & Arslan, A. (2019). The effects of environmental conditions on growths of halophilic archaea isolated from Lake Tuz. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(9), 5155-5162.
- Oren, A. (2002). Adaptation of halophilic archaea to life at high salt concentrations. In *Salinity: environment-plants-molecules* (pp. 81-96). Springer, Dordrecht.
- Oren, A. (2014). Taxonomy of halophilic Archaea: current status and future challenges. *Extremophiles*, 18(5), 825-834.
- Oren, A., & Shilo, M. (1981). Bacteriorhodopsin in a bloom of halobacteria in the Dead Sea. *Archives of Microbiology*, 130(2), 185-187.
- Oren, A., Ventosa, A., & Grant, W. D. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order Halobacteriales. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 47(1), 233-238.
- Paim, B. T., Leães, Y. S. V., Vargas, P. R. M. C., & da Silva, L. R. (2017). Análise bromatológica do charque de agroindústrias com sistema de inspeção sisbi-poa no município de alegre/rs. *Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp*, 520-523.
- Paixão, G. C.; Pantoja, L. D. M.; Brito, E. H. S.; Mourão, C. B. I. (2015). *Desvendando o mundo invisível da microbiologia*. EdUECE,
- Picchi, V. (2015). *História, ciência e tecnologia da carne bovina*. Paco Editorial.
- Quadri, I., Hassani, I. I., l'Haridon, S., Chalopin, M., Hacène, H., & Jebbar, M. (2016). Characterization and antimicrobial potential of extremely halophilic archaea isolated from hypersaline environments of the Algerian Sahara. *Microbiological research*, 186, 119-131.
- Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F., & Ramos-Cormenzana, A. (1980). Isolation of extremely halophilic bacteria able to grow in defined inorganic media with single carbon sources. *Microbiology*, 119(2), 535-538.
- Sahli, K., Gomri, M. A., Esclapez, J., Gómez-Villegas, P., Ghennai, O., Bonete, M. J., ... & Kharroub, K. (2020). Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. *Journal of basic microbiology*, 60(7), 624-638.

- Salgaonkar, B. B., & Rodrigues, R. (2019). A Study on the Halophilic Archaeal Diversity from the Food Grade Iodised Crystal Salt from a Saltern of India. *Microbiology*, 88(6), 709-719.
- Savage, K. N., Krumholz, L. R., Oren, A., & Elshahed, M. S. (2007). *Haladaptatus paucihalophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a low-salt, sulfide-rich spring. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 19-24.
- Schneegurt, M. A. (2012). Media and conditions for the growth of halophilic and halotolerant bacteria and archaea. In *Advances in understanding the biology of halophilic microorganisms* (pp. 35-58). Springer, Dordrecht.
- Singh, A., & Singh, A. K. (2018). Isolation, characterization and exploring biotechnological potential of halophilic archaea from salterns of western India. *3 Biotech*, 8(1), 1-15.
- Stan-Lotter, H., Pfaffenhuemer, M., Legat, A., Busse, H. J., Radax, C., & Gruber, C. (2002). *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5), 1807-1814.
- Tomlinson, G. A., & Hochstein, L. I. (1972). Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria. *Canadian journal of microbiology*, 18(5), 698-701.
- Tortora, G; Case, C; Funke, B (2017). *Microbiologia*. Artmed.
- Vidal, V. A., Biachi, J. P., Paglarini, C. S., Pinton, M. B., Campagnol, P. C., Esmerino, E. A., & Pollonio, M. A. (2019). Reducing 50% sodium chloride in healthier jerked beef: An efficient design to ensure suitable stability, technological and sensory properties. *Meat Science*, 152, 49-57.
- Vidyasagar, M., Prakash, S., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2007). Optimization of culture conditions for the production of halothermophilic protease from halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(5), 655-662.
- Williams, S. T. (1989). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins.
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4576-4579.
- Xu, Q., Cui, H. L., & Meng, F. (2019). *Haloprofundus halophilus* sp. nov., isolated from the saline soil of Tarim Basin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 112(4), 553-559.

4 CAPÍTULO 3: ARTIGO 3³

ATIVIDADE ENZIMÁTICA E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE HALOARCHAEA DETERIORANTE DE CHARQUE FRENTE A ÁCIDOS ORGÂNICOS (*Enzymatic activity and evaluation of the sensitivity of beef jerky spoilage haloarchaea to organic acids*)

Resumo

Objetivo-se estimar a produção de exoenzimas hidrolíticas e avaliar a sensibilidade de duas cepas de haloarchaea deteriorantes isoladas a partir do charque em relação a conservantes ácidos orgânicos (lático, cítrico e glucona-delta-lactona). Quanto à produção de amilase, celulase, lipase, gelatinase e caseinase, utilizou-se meios sólidos específicos com incubação a 37 °C no período de 15 dias para determinar o Índice Enzimático (IE), e para avaliar a suscetibilidade das cepas deteriorantes aos devidos ácidos utilizou-se a técnica de disco difuso em ágar (método de Kirby-Bauer) com diferentes ácidos variando suas concentrações de 0,5 a 5% diluídos em salmoura a 20% de NaCl. Os resultados dos ensaios enzimáticos mostram que as duas cepas foram negativas quando a produção das exoenzimas, exceto a cepa V22 que apresentou um bom IE (4,5) para produção de gelatinase. Em relação a sensibilidade dos ácidos orgânicos testados observou-se que em geral a utilização da concentração a partir de 2,5% pode ser utilizada para aumentar a vida útil do charque, mas que os ácidos lácticos e cítrico apresentaram maiores valores significativos em relação a inibição do crescimento das cepas testadas *in vitro* nas diferentes concentrações.

Palavra-chaves: atividade enzimática; ácidos; haloarchaea; sensibilidade

Abstract

This study aimed to estimate the production of hydrolytic exoenzymes and to evaluate the sensitivity of two spoilage haloarchaea strains isolated from jerked beef in relation to organic acid preservatives (lactic, citric and glucone-delta-lactone). amylase, cellulase, lipase, gelatinase and caseinase, specific solid media were used with incubation at 37 °C for a period of 15 days and after the Enzymatic Index (EI) was observed and to evaluate the susceptibility of the deteriorating strains to the due acids used the technique of diffuse disk in agar was used (Kirby-Bauer method) with different acids varying their concentrations from 0.5 to 5% diluted

³ Artigo será submetido na revista Archives of Veterinary Science, B4 em biotecnologia ISSN 1517-784X.

in brine to 20% of NaCl. The results of the enzymatic assays show that both strains were negative when producing exoenzymes, except for the V22 strain that showed a good IE (4.5) for gelatinase production. Regarding the sensitivity of the organic acids tested, it was observed that, in general, the use of a concentration from 2,5% can be used to increase the shelf life of the jerky, but that lactic and citric acids presented higher significant values in relation to the inhibition of growth of the strains tested in vitro at different concentrations.

Keywords: acids; enzymatic activity; haloarchaea; sensitivity

INTRODUÇÃO

Adaptados às altas concentrações de sal, os halófilos extremos necessitam de no mínimo 1,5 M (9%), mas em concentrações de 2 a 4 M de NaCl (12-23%) são valores ótimos para seu crescimento, entretanto algumas espécies são capazes de crescer em 5,5 M de NaCl, destacando-se os organismos pertencentes ao domínio archaea pois são únicos a se desenvolverem em ambientes extremos de salinidade como lagoas, bacias submarinas, desertos de sal, e em salinas solares construídas pelo homem para a exploração comercial de sal para uso alimentício (Tortora et al., 2017; Ghanmi et al., 2020 e Madigan et al., 2016).

Assim quando o sal não estéril é utilizado para conservar produtos alimentícios como carnes secas, pode haver o desenvolvimento dos halófilos é acarretando diversos problemas de deterioração que comumente é conhecida e caracterizada pelo aparecimento de colônias pigmentadas de vermelho à rosa e por apresentarem enzimas proteolíticas produzindo odores e aromas nesses produtos (Moschetti et al., 2006).

Por ser fortemente proteolítica e conseguir sobreviver em ambientes com altas concentrações salinas, o charque quando contaminado pode sofrer alterações indesejadas por esses organismos que produzem limosidade e odor extremamente desagradável. A principal técnica utilizada para conservação do charque frente a archaea halófilas é a utilização do envase a vácuo, visto que tais microrganismos são aeróbicos, entretanto qualquer deficiência na embalagem e porventura as concentrações de oxigênio aumentarem possivelmente ocorrerá seu desenvolvimento (Penha, 2017; Singh e Singh, 2018).

Deste modo, Lin et al. (2018) relatam que o estudo do emprego de ácidos orgânicos em produtos cárneos salgados, como antimicrobianos veem sendo largamente pesquisado com a finalidade de inibir a proliferação de deteriorantes e patogênicos para aumentar a vida de prateleira de produtos alimentícios. Para charque uma nova barreira (teoria dos obstáculos) ficou autorizado que é a utilização de aditivos intencionais com acidulante pela sua Instrução Normativa Nº 92, de 18 de setembro de 2020 do Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA), que até então era proibido o uso. Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 272, de 14 de março de 2019 da Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) para industrializados secos são permitidos o uso de acidulantes como ácido láctico, ácido cítrico e glucona-delta-lactona (GDL) tendo como limite máximo *quantum satis*, assim para o charque não há estudo quanti-qualitativos do sucesso do uso desses acidulantes em relação a essas cepas deteriorantes.

Apesar da sua ação deteriorante em produtos cárneos salgados, biotecnologicamente os halófilos podem ter a capacidade de servir como uma extensa gama de substâncias, como suas enzimas, para aplicações industriais devido à sua estabilidade sob as diversas condições extremas encontradas na indústria (Amoozegar et al., 2017; Gill et al., 2021).

Assim como os supracitados, outros pesquisadores como Singh e Singh, (2018), Menasria et al. (2018), Xu et al. (2019) e Sahli et al. (2020) relatam a produção de enzimas extracelulares hidrolíticas, principalmente proteases, por diversas espécies de archaea halófilas.

Segundo Gibtan et al. (2017), pesquisas microbiológicas e ecológicas de sais para fins alimentares são necessárias porque podem fornecer informações sobre a dinâmica microbiana correlata entre ambientes hipersalinos e alimentos salgados e fermentados. No entanto, toda a microbiota de sais comerciais ainda permanece obscura. Até onde se sabe, não há estudos sobre a ocorrência e diversidade de comunidades microbianas em sais comerciais no Brasil.

Mediante os fatos explorados acima neste estudo objetivou-se realizar a avaliação da produção de enzimas hidrolíticas extracelulares (exoenzimas) e avaliar a sensibilidade das cepas deteriorantes em relação a conservantes ácidos orgânicos (ácido láctico, ácido cítrico e glucona-delta-lactona) em diferentes concentrações em testes *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliação da atividade enzimática extracelular

Foram utilizadas neste trabalho duas cepas (C11 e V22) de haloarchaea previamente isoladas e estudadas pelos próprios autores (Chagas Júnior et al. 2022) a partir de charque em estado de deterioração. Antes de realizar os experimentos, as cepas congeladas preservadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi, foram reativadas em um meio de enriquecimento e cultivo (MEC) pela técnica de estriamento.

O meio MEC era composto por 5 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 200 g L⁻¹ de NaCl, 30 g MgCl₂·6H₂O, 30 g MgSO₄·7H₂O, 0,5 g de CaCl₂·2H₂O, e 7 g de KCl, o pH foi ajustado para 7,2. Para meio sólido foi adicionado 17 g L⁻¹ de ágar.

Para a avaliação da atividade enzimática extracelular foram utilizados meio MEC com diferentes fontes de carbono requeridas nos ensaios enzimáticos, uma cepa por placa foi inoculada com o uso de palitos de dente estéreis.

A avaliação da capacidade lipolítica das cepas foi realizada em meio MEC suplementado com 1% de Twen-80 e pH ajustado para 6,0 com ácido acético de acordo com o método de Sierra (1956) e Stamford et al. (1998) com modificações. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por 15 dias, após esse período as placas com as colônias foram mantidas durante 24 h sob refrigeração para induzir a formação de cristais de cálcio, caracterizado pela presença de halo transparente em volta da colônia.

Para avaliar a atividade proteolítica (gelatinase e caseinase) foi utilizado meio MEC com modificações utilizando 1% de gelatina e leite desnatado como fonte de carbono. As placas foram incubadas por 15 dias a 37 °C. A hidrólise de gelatina e caseína foi determinada observando a olho nu a formação de zonas claras em torno das colônias em meio MEC (Holding e Collee, 1971).

Para avaliar a capacidade aminolítica as cepas foram cultivadas em ágar MEC suplementado com 1% de amido solúvel, incubadas a 37 °C por 15 dias. Após o período de incubação as placas foram tratadas com vapor de iodo para a revelação os halos de hidrólise segundo a metodologia de Kasana (2008).

Os diâmetros dos halos de hidrólise (H) e do crescimento das colônias (C) foram aferidos com auxílio de paquímetro (mm) e os resultados foram dados como Índice Enzimático (IE), que é a relação H/C, segundo proposto por Hankin e Anagnostakis (1975). Assim, quanto maior o índice maior é a atividade enzimática no meio.

Teste de sensibilidade a conservantes ácidos orgânicos

Para avaliar a suscetibilidade das cepas deteriorantes isoladas do charque ácidos láctico, ácido cítrico e glucona-delta-lactona, utilizou-se a técnica de disco difuso em ágar (método de Kirby-Bauer). As cepas halófilas foram crescidas em caldo MEC por 15 dias a 37 °C em estufa para a obtenção do pré-inóculo na concentração final 10^8 UFC mL⁻¹.

Após esse período imergiu-se um *swab* estéril na suspensão do pré-inóculo das cepas, retirando-se o excesso de inóculo através da compressão do *swab* nas paredes do tubo e semeou-se a placa uniformemente em estrias por rotações a cada 60 graus.

A seguir discos de papel filtro de 6 mm foram embebidos com 10 µL das soluções contendo diferentes concentrações dos ácidos a serem testados e após foram colocados sobre a superfície do ágar inoculado. Os ácidos (láctico, cítrico e glucona-delta-lactona) foram

devidamente diluídos em salmoura a 20% de NaCl visando a aplicabilidade deste teste a indústria no qual a solubilização destes podem ser realizados na etapa de elaboração da salmoura. As concentrações variaram de 0,5 a 5%, totalizando 10 ensaios para cada ácido testado.

Foi inserido três disco por placa, um de cada ácido na mesma diluição e a disposição dos discos foi tal que sua distância até a lateral da placa fosse maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição (Ostrosky, 2008).

Após o período de incubação, a sensibilidade foi baseada na presença de halo de inibição de crescimento, aferida utilizando-se um paquímetro manual para a obtenção das médias do diâmetro de halo de inibição. Para avaliar o potencial dentre os ácidos e a Concentração Mínima Inibitória (CIM), os dados foram analisados por meio da análise de variância (Anova) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância para a comparação de médias usando o programa Sisvar. Os experimentos foram realizados em triplicata e o delineamento experimental foi realizado em blocos inteiramente casualizados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Determinação da atividade enzimática extracelular

Os isolados selecionados foram testados quanto à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares, incluindo amilase, celulase protease (caseinase e gelatinase) e lipase. O *screening* em meio sólido para os substratos contendo diferentes fontes de carbono revelou o potencial das cepas em secretar enzimas, sendo que a cepa C11 não produziu nenhuma das enzimas testadas e a cepa V22 produziu apenas a gelatinase, a tabela 5 apresenta os resultados dos valores de I.E das cepas testadas nos diferentes substratos.

Tabela 5 - Valores de Índice Enzimático (I.E), média das 3 repetições.

Substrato	I.E das cepas	
	C11	V22
Amilase	-	-
Celulase	-	-
Caseínase	-	-
Gelatinase	-	4,5
Lipase	-	-

(-) Indica resultado negativo para o teste em questão

Como biocatalizadores, atualmente as enzimas microbianas são vastamente utilizadas em diversas áreas industriais pois detém uma especificidade química e contribui para preservação ambiental frente a outros compostos químicos. Neste contexto as enzimas extremofílicas, podem ser a melhor opção para catalisar condições industriais e produzir novos produtos biotecnológicos sob diferentes condições extremas (Amoozegar et al., 2017).

Segundo Lealem e Gashe (1994), apesar de todos os microrganismos produzirem enzimas, nem todos são considerados como bons produtores, deste modo quando o índice enzimático (I.E) é maior ou igual a dois em ensaios em meios sólidos são considerados bons produtores de enzimas extracelulares visto que o I.E é a habilidade do microrganismo em degradar substratos específicos.

A cepa V22 apresentou um bom potencial (I.E de 4,5) em produção e secreção de protease como a gelatinase, que conforme Menasria et al. (2018), esta enzima que tem como função hidrolisar a gelatina, o colágeno e alguns peptídeos.

As proteases com atividade gelatinolítica vem sendo alvo de muitas pesquisas devido a sua aplicabilidade na indústria química, médica e processamento de alimentos, existindo assim uma alta demanda na busca de novas cepas microbianas com novas propriedades para o desenvolvimento principalmente ligados a formulações farmacêuticas (Ekpenyong et al., 2016). Tal potencial proteolítico explica sua forte ligação com a deterioração de produtos cárneos salgados como o charque.

Os microrganismos patogênicos são aqueles que geralmente secretam este tipo de enzimas, logo a busca por espécies microbianas não patogênicas com potencial para a produção em larga escala de gelatinase vem sendo foco de pesquisadores (Balan et al., 2012).

Singh e Singh (2018) e Sahli et al. (2020) reportam que a maioria das haloarchaea produzem e secretam enzimas proteolítica e que conseqüentemente essas proteínas produzidas são eficientes para catalisar reações sob condições de alto teor de sal, pois são ativas e estáveis em meios salinos, onde geralmente a estrutura e a função de outras enzimas são criticamente afetados levando à precipitação ou desnaturação de outras proteínas não halofílicas, tornando-se adequadas para exploração e aplicações comerciais à base de sal, como molho de peixe, preparações de revestimento anti-incrustante, tratamento de resíduos com alto teor de sal, elaboração de detergentes e indústria de couro.

A capacidade proteolítica das cepas halofílicas é relatada nas pesquisas de Menasria et al. (2018), como também a produção de gelatinase e caseinase reportada nos estudos de Hasan e Mohammadian (2011), a partir de cepa isolada de sal do Irã. Sahli et al. (2020), relatam que as cepas isoladas de ambientes hipersalinos da Argélia foram capazes de hidrolisar gelatina

e Tween-80 (48% e 45% dos isolados, respectivamente), como também a hidrólise do amido foi detectado em 22% das cepas testadas e nenhum deles hidrolisou caseína.

A ausência da atividade enzimática conforme explica Vasconcelos et al. (2003) pode ser imposta à incapacidade de secreção pelas cepas testadas, seja pela insuficiência dos métodos de detecção utilizados ou pelo direcionamento da produção para o metabolismo intracelular dos microrganismos. Em seu estudo Xu et al. (2019), relatam que a espécie *Haloprofundus halophilus* foi incapaz de hidrolisar caseína, gelatina, amido ou Tween 80 o que corrobora com os resultados encontrados para a cepa C11 nesse estudo.

Na literatura é evidente que as haloarchaeas são capazes de utilizar diversos compostos orgânicos como única fonte de carbono e energia e produzir várias enzimas hidrolíticas, todavia ainda há uma escassez de estudos dessas enzimas halofílicas e que ainda não são empregados para processos industriais conforme explica Menasria et al. (2018).

As vantagens de se utilizar enzimas halofílicas estão vinculadas principalmente por não precisar de purificação ou esterilização para uso e aplicação, uma vez que proteínas contaminantes indesejadas ou outras biomoléculas são inativas em condições salinas (Amoozegar et al., 2017).

Determinação da sensibilidade a conservantes ácidos orgânicos

Na avaliação da sensibilidade aos ácidos orgânicos aqui testados, os resultados de modo geral demonstraram que os três ácidos conseguiram inibir o crescimento das haloarchaea examinadas a partir a concentração 2,5%. Logo considera-se tal valor como uma concentração inibitória mínima (CIM) no qual é a concentração mais baixa de um agente antibacteriano em mg L^{-1} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) que, sob condições *in vitro* estritamente controladas, impede completamente o crescimento viável de uma cepa de teste de um organismo conforme descrito por Kowalska-Krochmal e Dudek-Wicher (2021).

Estes resultados estão de acordo com a literatura conforme descrito por Nascimento (2011) onde descreve que a indústria alimentícia já utiliza ácidos em particular a concentração de 2% visto que tal valor vem apresentando um controle e redução eficaz de patógenos.

Entretanto na comparação da eficiência entre os três ácidos em relação a inibição das cepas foi observado que para a cepa C11 o ácido láctico foi aquele que apresentou a melhor inibição significadamente seguido pelo ácido cítrico e para a cepa V22 o ácido cítrico foi o melhor inibidor significadamente, seguido pelo láctico. Entretanto na comparação geral a glucona não apresentou resultados significativos quando comparadas com os outros ácidos, conforme é apresentado os resultados das médias dos halos de inibição nas tabelas 6 e 8 e as

tabelas 7 e 9 são apresentados os resultados para a análise de variância para cepa C11 e V22 respectivamente.

Tabela 6 - Valores médios e desvio padrão do halo de inibição em diferentes concentrações para cepa C11.

Concentração (%)	Halo de inibição (cm)		
	Lático	Glucona	Cítrico
0,5	1,0 ± 0,216 ^a	0,0 ^b	0,0 ^b
1,0	1,0 ± 0,29 ^a	0,0 ± 0,28 ^b	1,0 ± 0,28 ^a
1,5	1,0 ± 0,08 ^a	0,0 ± 0,08 ^b	1,0 ± 0,37 ^a
2,0	1,0 ± 0,21 ^a	0,5 ± 0,29 ^c	1,0 ± 0,57 ^b
2,5	2,0 ± 0,35 ^a	0,5 ± 0,63 ^c	1,0 ± 0,63 ^b
3,0	2,0 ± 0,32 ^a	0,5 ± 0,24 ^b	2,0 ± 0,24 ^a
3,5	2,0 ± 0,16 ^a	1,0 ± 0,16 ^b	2,0 ± 0,21 ^a
4,0	2,5 ± 0,81 ^a	1,0 ± 0,40 ^b	2,5 ± 0,40 ^a
4,5	3,0 ± 0,21 ^a	1,0 ± 0,08 ^b	3,0 ± 0,14 ^a
5,0	3,5 ± 0,35 ^a	1,5 ± 0,57 ^b	3,5 ± 0,80 ^a

Médias seguidas com a mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05\%$)

Tabela 7 - Tabela de análise de variância para cepa C11.

FV	GL	SQ	QM	Pr>FC
Ácidos	2	10,31	5,15	0,000
Concentração	9	17,37	1,93	0,000
Ácidos* Concentração	18	2,35	0,13	0,000
Erro	0			
Média Geral	1,416			
CV (%)	0,00			

Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão do halo de inibição em diferentes concentrações para cepa V22.

Concentração (%)	Halo de inibição (cm)		
	Lático	Glucona	Cítrico
0,5	0,0 ^b	0,0 ^b	0,5 ± 0,28 ^a
1,0	0,0 ^b	0,0 ^b	0,9 ± 0,50 ^a
1,5	0,5 ± 0,14 ^b	0,0 ^c	1,0 ± 0,28 ^a
2,0	1,1 ± 0,92 ^a	0,0 ^c	1,0 ± 0,24 ^b
2,5	1,0 ± 0,95 ^b	1,2 ± 0,08 ^a	1,0 ± 0,24 ^a
3,0	1,5 ± 0,21 ^b	1,4 ± 0,21 ^c	2,0 ± 0,35 ^a
3,5	2,2 ± 0,21 ^a	1,4 ± 0,08 ^c	1,5 ± 0,24 ^b
4,0	2,2 ± 0,28 ^b	1,5 ± 0,29 ^c	2,0 ± 0,48 ^a
4,5	3,1 ± 0,50 ^a	1,8 ± 0,08 ^c	2,7 ± 0,40 ^b
5,0	3,0 ± 0,21 ^b	3,0 ± 0,57 ^c	4,0 ± 0,80 ^a

Médias seguidas com a mesma letra (linha) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05\%$)

Tabela 9 - Tabela de análise de variância para cepa V22.

FV	GL	SQ	QM	Pr>FC
Concentração	9	28,94	3,21	0,000
Ácidos	2	2,34	1,17	0,000
Ácidos* Concentração	18	1,80	0,10	0,000
Erro	0			
Média Geral	1,39			
CV (%)	0,00			

Rebonatto et al. (2018), concernem que a indústria alimentícia vem utilizando bastantes conservantes mais naturais como os diversos tipos de ácidos orgânicos existentes devido a sua a sua rapidez, simplicidade, baixo custo e eficiência, entretanto apesar de difundidos seu emprego se mantém restrito a determinados compostos, se observar a variedade de outros antimicrobianos disponíveis.

Por se tratarem de metabólitos primários e/ou secundários de microrganismos ou plantas, o uso de substâncias naturais como os ácidos orgânicos se destacam no prolongamento de vida útil dos produtos alimentícios e garantem segurança, além também de minimizar a oxidação lipídica, reduzir as perdas de cor se tornando grandes aliados na chamada biopreservação (Barcenilla et al., 2022).

Os ácidos orgânicos como agentes de biopreservação ideias devem apresentar atividade antimicrobiana exclusiva contra organismos deteriorantes ou patogênicos, agindo como parte de uma abordagem da tecnologia de barreiras sendo utilizados estrategicamente com outras barreiras para que possa culminar no sinergismo de uma series de obstáculos indesejáveis para o crescimento microbiano o que garantirá a inocuidade do produto (Pisoschi et al., 2018).

Estudos na literatura comprovam a eficácia na utilização de ácidos orgânicos na conservação de produtos cárneos, como reportado por Freiburger (2016) que relata que na produção de linguiças curadas cozidas embaladas a vácuo tiveram um aumento na vida útil após serem tratadas com uma mistura de ácidos orgânicos. Reis et al. (2018) observaram em seu estudo que a utilização de ácido láctico à 1% foi eficiente provocando menor escurecimento das amostras como também havendo uma redução da contagem de *Escherichia coli* após 14 dias.

Segundo Cramer e Prestegard (1977), a capacidade de inibição dos ácidos está relacionada ao valor do pH do meio que deve ser menor que o pKa do ácido em questão, pois a ação antimicrobiana é atribuída a forma não dissociada do ácido.

Considerado um eficiente antimicrobiano o ácido láctico (ácido fraco) de cadeia curta (CH₃-CHOH-COOH), segundo Rebonatto et al. (2018), está comumente relacionado ao

controle bacteriano, visto que ao observar os resultados obtidos em diversas pesquisa *in vitro* os autores propõem que a indústria realize mais testes *in loco*.

A ação antibacteriana do ácido lático é atribuída à capacidade de atravessar as membranas celulares, resultando em pH intracelular diminuído e ruptura da força motriz do próton transmembrana, e vem sendo utilizados para reduzir a carga microbiológica em carcaças e, assim, preservar a qualidade da carne fresca (Pisoschi et al., 2018).

Já o ácido cítrico é geralmente reconhecido como seguro para uso como ingrediente alimentar e é frequentemente usado para inativar patógenos, podendo inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* e seu efeito antimicrobiano é conferido pela ação de ruptura da membrana, inibição de reações metabólicas essenciais, estresse na homeostase do pH intracelular e acúmulo de ânions tóxicos (Jeon e Há, 2020).

Mediante os relatos supracitados é evidente o grande benefício de utilizar-se ácidos orgânicos em produtos alimentícios cárneos como o charque, por serem naturais constituindo uma alternativa aos sintéticos além de poder ter uma maior aceitação pelo consumidor.

CONCLUSÃO

A cepa C11 não apresentou atividade enzimática frente aos substratos testados, enquanto a cepa V22 apresentou um bom potencial biotecnológico na produção e secreção de gelatinase. Em relação a sensibilidade dos ácidos orgânicos testados observou-se que em geral a utilização da concentração a partir de 2,5% pode ser utilizada para aumentar a vida útil do charque, mas que os ácidos láticos e cítrico apresentaram maiores valores significativos em relação a inibição do crescimento das cepas testadas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

AMOOZEGAR, M. A. et al. Systematics of haloarchaea and biotechnological potential of their hydrolytic enzymes. **Microbiology**, v. 163, n. 5, p. 623-645, 2017.

ANTUNES, A. et al. Bioprospecting archaea: focus on extreme halophiles. In: **Bioprospecting**. Springer, Cham, p. 81-112, 2017.

BALAN, S. S. et al. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus spp* isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3, p. S1811-S1816, 2012.

BARCENILLA, C. et al. Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. **Meat Science**, v. 183, p. 108661, 2022.

BRASIL. (2020). Instrução normativa nº 92, de 18 de setembro de 2020. Dispõe Sobre a Identidade e os Requisitos de Qualidade do Charque, da Carne Salgada Curada Dessecada, do Miúdo Salgado Dessecado e do Miúdo Salgado Curado Dessecado. Disponível em <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-92-de-18-de-setembro-de-2020-278692460>

BRASIL. (2019). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Disponível em <https://in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>

CRAMER, J. A.; Prestegard, J. H. NMR studies of pH-induced transport of carboxylic acids across phospholipid vesicle membranes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 75, n. 2, p. 295-301, 1977.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; et al. Isolation and characterization of halophilic strains from beef jerky. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. e21511326368, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i3.26368. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/26368>. Acesso em: 23 feb. 2022.

EKPENYONG, M. et al. Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia* sp. SLO3. **Nigerian Journal of Biopesticides**, v. 1, p. 70-82, 2016.

FREIBERGER, R. C. D. P. **Utilização de ácidos orgânicos como conservantes em linguiças curadas cozidas embaladas a vácuo.** (2016).77f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

GHANMI, F. et al. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* ETD5 from the solar saltern of Sfax (Tunisia) produces multiple halocins. **Research in microbiology**, v. 171, n. 2, p. 80-90, 2020.

GIBTAN, A. et al. Diversity of extremely halophilic archaeal and bacterial communities from commercial salts. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 799, 2017.

GILL, R. et al. Recent Biotechnological Applications of Archaeal Domain. **Plant-Microbe Dynamics: Recent Advances for Sustainable Agriculture**, v. 1, p. 135, 2021.

HASAN, S.M.; MOHAMMADIAN, J. Isolation and characterization of *Halobacterium salinarum* from saline lakes in Iran. **Jundishapur J Microbiol**, v.4, p. 59–66, 2011.

HOLDING, A. J.; COLLEE, J. G. Chapter I Routine biochemical tests. In: **Methods in microbiology**. Academic Press, p. 1-32, 1971.

JEON, M.; HA, J. Synergistic bactericidal effect and mechanism of X-ray irradiation and citric acid combination against food-borne pathogens on spinach leaves. **Food Microbiology**, v. 91, p. 103543, 2020.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503-507, 2008.

KOWALSKA-KROCHMAL, B.; DUDEK-WICHER, R. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 165, 2021.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a Gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eragrostis tef*). **Journal of Applied bacteriology**, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LIN, L. et al. Assessment of the inhibitory effects of sodium nitrite, nisin, potassium sorbate, and sodium lactate on *Staphylococcus aureus* growth and staphylococcal enterotoxin A production in cooked pork sausage using a predictive growth model. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 1, p. 83-90, 2018.

MADIGAN, M.T. et al. **Microbiologia de Brock-14ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

MENASRIA, T. et al. Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. **Microbiological research**, v. 207, p. 289-298, 2018.

MOSCHETTI, G. et al. Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. **Annals of microbiology**, v. 56, n. 2, p. 119-127, 2006.

NASCIMENTO, E.P.S. **Efeito do ácido láctico sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais na carne de sol**. 2011. 104 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PENHA, J. C. Q. **Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e parasitológica da carne bovina salgada comercializada em estabelecimentos e feiras livres na zona norte do município do Rio de Janeiro**. 2017. 114 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

PISOSCHI, A. M. et al. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922-935, 2018.

REBONATTO, B. et al. Sinergismo entre ácidos orgânicos e sorbato de potássio no controle de *Aspergillus flavus*. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 3, p. 114-125, 2018.

REIS, H. Z. M. et al. Utilização de ácidos orgânicos para a conservação de carnes: alterações físicas e microbiológicas. **Archives of Veterinary Science**, v. 23, n. 3, 2018.

SAHLI, K. et al. Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 624-638, 2020.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15-22, 1957.

SINGH, A.; SINGH, A. K. Isolation, characterization and exploring biotechnological potential of halophilic archaea from salterns of western India. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Food Science and Technology**, v. 18, p. 382-385, 1998.

TORTORA, G; CASE, C; FUNKE, B. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VASCONCELOS, W. E. et al. Caracterização bioquímica e enzimática de *Cunninghamella* isoladas de manguezal. **Revista de Biotecnologia e Ciência da Terra, Anápolis**, v. 3, p. 18, 2003.

XU, Q.; CUI, H. L.; MENG, F. *Haloprofundus halophilus* sp. nov., isolated from the saline soil of Tarim Basin. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 4, p. 553-559, 2019.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir desse estudo conclui-se assim que a partir do charque em estado de deterioração pode-se isolar e caracterizar duas cepas extremamente halofílicas pertencente ao domínio Archaea da classe Halobacteria pela suas características apresentadas como gram-negativas, catalase e oxidase negativa, morfologia celular em cocos (C11) e pleomorfica (V22), ainda as linhagens foram neutrófilas e não houve crescimento em meio com pH 5 e 9.

As melhores condições de cultivos para as variáveis testadas foram de 200 e 300 g L⁻¹ (3,4 M) de NaCl, 25 e 35 g L⁻¹ de MgCl₂ e 5 g L⁻¹ de extrato de levedura respectivamente para a C11 e V22.

A cepa C11 não apresentou atividade enzimática frente aos substratos testados, enquanto a cepa V22 apresentou um bom potencial biotecnológico na produção e secreção de gelatinase.

Em relação a sensibilidade dos ácidos orgânicos testados observou-se que em geral a utilização da concentração a partir de 2,5% pode ser utilizada para aumentar a vida útil do charque, mas que os ácidos lácticos e cítrico apresentaram maiores valores significativos em relação a inibição do crescimento das cepas testadas *in vitro*.

Assim o conhecimento das características morfofisiológicas e bioquímicas das cepas se torna-se necessária quando se busca estabelecer barreiras frente a proliferação e deterioração de produtos cárneos salgados por esses organismos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAGLAYAN, P. et al. Screening of Industrially Important Enzymes Produced by Moderately Halophilic Bacteria Isolated from Salted Sheep Skins of Diverse Origin. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 112, n. 06, p. 207-216, 2017.

GHANMI, F. et al. The extremely halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* ETD5 from the solar saltern of Sfax (Tunisia) produces multiple halocins. **Research in microbiology**, v. 171, n. 2, p. 80-90, 2020.

KRZMARZICK, M. J. et al. Diversity and niche of archaea in bioremediation. **Archaea**, V.2018, 2018.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre, PR: Artmed, 2016.

MOSCHETTI, G. et al. Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. **Annals of microbiology**, v. 56, n. 2, p. 119-127, 2006.

PIRES, E. C. C. **Riqueza do domínio Archaea no solo do bioma Cerrado**. 2012. 83 p. Dissertação (Mestrado em Biologia molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, DF.

SAHLI, K. et al. Bioprospecting and characterization of pigmented halophilic archaeal strains from Algerian hypersaline environments with analysis of carotenoids produced by *Halorubrum* sp. BS2. **Journal of basic microbiology**, v. 60, n. 7, p. 624-638, 2020.

SINGH, A.; SINGH, A. K. Isolation, characterization and exploring biotechnological potential of halophilic archaea from salterns of western India. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre, PR: Artmed, 2017.