



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
ENGENHARIA DE AQUICULTURA**



Ana Caroline Gonçalves da Silveira

***Bacillus* sp. COMO BIORREMEDIADOR EM SEDIMENTO DE
CARCINICULTURA.**

Florianópolis

2020

Ana Caroline Gonçalves da Silveira

***Bacillus* sp. COMO BIORREMEDIADOR EM SEDIMENTO DE
CARCINICULTURA.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Engenharia de Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Prof^o Dr. José Luiz Pedreira Mourinho.

Florianópolis

2020

Ana Caroline Gonçalves da Silveira

***Bacillus* sp. COMO BIORREMEDIADOR EM SEDIMENTO DE
CARCINICULTURA.**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido a banca examinadora do Curso de Engenharia de Aquicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Florianópolis, ____ de Dezembro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. José Luiz Pedreira Mouriño.
Orientador

Mestre Gustavo Ruschel Lopes
Examinador

Dra. Scheila Anelise Pereira
Examinadora

Florianópolis
2020

A minha mãe e irmãos por todo apoio e compreensão, em
memória de meu pai que não pôde me ver formada.

RESUMO

Dentre os segmentos da aquicultura o cultivo de camarões são um dos mais expressivos. Em 2018 o mercado global de camarões movimentou US\$ 45 bilhões (Shrimp Market – Growth, Trends, and Forecast (2019 – 2024)). Seguindo essa conjuntura a carcinicultura Brasileira vem ganhando seu espaço e valor de produção em decorrência dos avanços tecnológicos da reprodução em cativeiro destes organismos. Atualmente, a espécie de camarão mais cultivada mundialmente é o *Litopenaeus vannamei* e, sua produção na maioria das vezes ocorre em viveiros de terra, sem o emprego de impermeabilização com o uso de lonas, por exemplo. Durante o cultivo desses animais ocorre o acúmulo de matéria orgânica no fundo dos viveiros, que quando não tratados, podem promover a liberação de compostos tóxicos e a proliferação de bactérias patogênicas, levando a morte dos animais do cultivo. Este excesso de matéria orgânica se configura como um dos grandes problemas da atividade, a qual gera despesas adicionais e manejo extra nas unidades de cultivo. Portanto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da utilização do produto comercial composto por *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis*, em diferentes concentrações e periodicidades de aplicação, na melhoria da qualidade do sedimento de viveiros de carcinicultura intensiva.

Para tal, o sedimento foi coletado de viveiros de carcinicultura, logo após a despesca. Um total de 250L de sedimento, foram misturados para se obter amostras homogêneas e em seguida e distribuídos aleatoriamente em 25 unidades experimentais, separados em cinco grupos com cinco repetições cada. Os grupos avaliados foram: controle, solo sem adição de biorremediador, com adição do biorremediador PureGro® na concentração de 150g por/hectare e com adição do biorremediador PureGro® na concentração de 300g por/hectare aplicados a cada três e seis dias. Após 15 dias de ensaio, amostras do sedimento foram coletadas para avaliar teor de carbono, a atividade bacteriana por cromatografia de Pfeiffer e análise de respirometria.

Com isso foi possível verificar que o solo, o qual recebeu maior concentração do biorremediador (300g há⁻¹) e com aplicações mais frequentes (a cada três dias), apresentou maior eficiência na redução da matéria orgânica, taxa de respiração e atividade dos microrganismos observado pela cromatografia de Pfeiffer. Estes resultados comprovam que houve uma colonização e melhoria do solo com a adição do biorremediador. Sendo assim, recomenda-se a utilização do biorremediador PureGro® na concentração de 300 g por /hectare, com aplicação a cada 3 dias.

Palavras-chave: Microbiota, sedimento, matéria orgânica, probióticos, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

Among the aquaculture segments, shrimp farming is one of the most expressive. In 2018, the global shrimp market moved US \$ 45 billion (Shrimp Market - Growth, Trends, and Forecast (2019 - 2024)). Following this conjuncture, Brazilian shrimp farming has been gaining its space and production value as a result of technological advances in captive reproduction of these organisms. Currently, the species of shrimp most cultivated worldwide is *Litopenaeus vannamei* and, its production most often occurs in land nurseries, without the use of waterproofing with the use of tarpaulins, for example. During the cultivation of these animals there is an accumulation of organic matter at the bottom of the nurseries, which, when not treated, can promote the release of toxic compounds and the proliferation of pathogenic bacteria, leading to the death of the animals in the cultivation. This excess of organic matter is configured as one of the major problems of the activity, which generates additional expenses and extra handling in the cultivation units. Therefore, the objective of the work was to evaluate the efficiency of the use of the commercial product composed of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*, in different concentrations and application periods, in improving the sediment quality of intensive shrimp nurseries.

For this purpose, the sediment was collected from carcinuculture nurseries, shortly after harvesting. A total of 250L of sediment was mixed to obtain homogeneous samples and then randomly distributed in 25 experimental units, separated into five groups with five replicates each. The evaluated groups were: control, soil without addition of bioremediation, with addition of PureGro® bioremediation at a concentration of 150g per / hectare and with addition of PureGro® bioremediation at a concentration of 300g per / hectare applied every three and six days. After 15 days of testing, samples of the sediment were collected to assess carbon content, bacterial activity by Pfeiffer chromatography and respirometry analysis.

Thus, it was possible to verify that the soil, which received a higher concentration of the bioremediator (300g ha⁻¹) and with more frequent applications (every three days), showed greater efficiency in reducing organic matter, respiration rate and microorganism activity. observed by Pfeiffer chromatography. These results prove that there was a colonization and improvement of the soil with the addition of the bioremediator. Therefore, it is recommended to use the PureGro® bioremediator at a concentration of 300 g per / hectare, with application every 3 days.

Keywords: Sediment, organic matter, probiotics, *Litopenaeus vannamei*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da cromatografia de Pfeiffer.....	17
Figura 2 - Respirometria do sedimento	18
Figura 3 - Disposição das unidades experimentais.....	18
Figura 4 - Diferenciação entre as zonas do cromatograma.....	21
Figura 5 – Análise de cromatografia de Pfeiffer	23
Figura 6 – Respirometria de sedimento.....	25

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	HIPÓTESE.....	13
1.2	OBJETIVOS	13
1.3	Objetivo Geral	13
1.4	Objetivos Específicos	14
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
2.1	Local e material biológico	14
2.2	Delineamento experimental.....	15
2.3	Preparo dos inóculos bacterianos.	15
2.3.1	Análise de teor de carbono do sedimento.....	15
2.3.2	Cromatografia circular de Pfeiffer.	16
2.3.3	Respirometria do sedimento.....	17
2.3.4	Análise estatística.....	19
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1	Análise de teor de carbono do sedimento.....	19
3.2	Cromatografia circular de Pfeiffer	20
3.2.1	Interpretação química da cromatografia.....	23
3.2.2	Respirometria do sedimento.....	25
4	CONCLUSÃO	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Mundialmente hoje os pescados são uma das principais fontes de proteína para o consumo humano. Tal fato pode ser evidenciado pelo recorde de 20,5 kg per capita por ano, de consumo destes com perspectiva de aumento para a próxima década (FAO 2020). De acordo com o novo relatório da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2020), a produção total de pescados deve aumentar de 171 milhões de toneladas no ano de 2018 para 204 milhões de toneladas até 2030. Esta organização salienta ainda, que é necessário o desenvolvimento sustentável da aquicultura para que esta tendência seja alcançada.

A produção aquícola Brasileira, por sua vez, está baseada, há produção de peixes, ostras, vieiras, mexilhões e camarões. Dentre estes a produção de camarão é bem expressiva, pois em 2019 somou 45,8 mil toneladas, com um aumento de 11,4% em relação ao ano anterior (IBGE). Não é o maior produtor mundial mas é líder em produtividade.

A atividade da carcinicultura marinha teve início na década de 1970 no país. No entanto, somente em 1980, surgiu o interesse do setor empresarial na produção de camarões peneídeos (*Marsupenaeus japonicus*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus subtilis*, *F. brasiliensis* e *F. paulensis*) (Magalhães, 2004). Mas foi no início dos anos 1990, que a atividade se desenvolveu com a introdução da espécie exótica (*Litopenaeus vannamei*), a qual é nativa da costa sul-americana do Pacífico e, conhecido como camarão branco do pacífico, o *L. vannamei* é a espécie de camarão mais cultivada atualmente (Senar, Brasília, 2017).

A produção extrativa de camarão já atingiu o seu limite de exploração sustentável (FAO 2008), porém ainda existe uma demanda mundial por esse nobre produto, que só poderá ser atendida através da produção advinda da atividade de cultivo. Hoje as produções contam com novas tecnologias, que possibilitam a intensificação e aumento das densidades, porém essa intensificação, quando realizada de maneira irracional, acarreta no aumento de resíduos com potencial poluidor, como matéria orgânica.

A matéria orgânica em excesso, de uma unidade de cultivo advém dos “inputs” de produção, ou seja, estão relacionados ao aumento da densidade de estocagem característico dos cultivos intensivos, bem como da taxa de arazoamento. O principal elemento da matéria orgânica é o carbono, pois representa de 45 a 57% (Boyd, 1995;

Boyd et al., 2002; Nelson; Cox, 2014). Portanto o carbono é o elemento encontrado em maior proporção no sedimento dos viveiros (Boyd et al., 2002), sendo oriundo de fezes, resíduos de alimentos não consumidos, animais mortos, restos de vegetais e da troca de carapaça dos animais de cultivo (Avnimelech et al., 2004; Avnimelech; Ritvo, 2003).

A medida que as concentrações de nutrientes como carbono, nitrogênio e fósforo aumentam no cultivo, há a aceleração da produtividade primária, que alteram a ecologia do sistema aquático (Macedo e Sipaúba-Tavares, 2010), a qual contribui para a elevação da biomassa fitoplanctônica e conseqüente diminuição na penetração de luz (Esteves, 1998). Nesse estágio, o ecossistema pode produzir mais matéria orgânica do que as bactérias heterotróficas são capazes de consumir. Nesse momento o sistema fica propenso a proliferação de bactérias patogênicas, que podem levar a morte dos animais de cultivo. Uma alternativa para esse problema é a retirada do excesso de matéria orgânica no fundo dos viveiros após a despesca, porém tal processo pode se tornar uma etapa onerosa no processo produtivo.

Um dos processos indicados como alternativa para remediar problemas com ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e sedimentos, incluindo sedimentos com excesso de matéria orgânica, é a biorremediação, sendo uma alternativa ecologicamente adequada e eficaz no tratamento de ambientes contaminados com moléculas orgânicas de difícil degradação (Gaylarde, Bellinaso, Manfio, (2005). A biorremediação pode ser compreendida como um processo onde organismos vivos, geralmente plantas ou microrganismos são utilizados para reduzir ou remover poluentes do ambiente.

Os processos biológicos de descontaminação enquadrados na categoria de biorremediação, utilizam, geralmente microrganismos autóctones (do próprio ambiente) ou alóctones (na sua forma nativa, ou modificados geneticamente). A microbiota do sedimento é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia dentro do sedimento e coluna d'água. Estes microrganismos exercem influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais (Jenkinson & Ladd, 1981). Algumas bactérias possuem reconhecida ação na decomposição de matéria orgânica, como por exemplo os pertencentes ao gênero *Bacillus* (De Marco et al., 2017).

O gênero *Bacillus* sp. são bactérias capazes de produzirem enzimas importantes para o processo de decomposição da matéria orgânica presente no sedimento. Os *Bacillus subtilis* e ou *B.licheniformis* são conhecidas por produzir hidrolases como as proteases

(Degering et al., 2010), lipases (Iqbal and Rehman, 2015), amilases (Raul et al., 2014), quitinases (Trachuk et al., 1996), celulasas (De Marco et al., 2017) e xilanases (Ki-Hong, 2009 e Yi et al., 2011) as quais podem auxiliar no processo de decomposição da matéria orgânica. O processo de degradação passa por várias etapas, e tem a participação de diferentes enzimas específicas, essas podem atuar simultaneamente em diferentes componentes da fração de sedimento.

Estas bactérias são capazes de decompor matéria orgânica, em aerobiose ou anaerobiose e, uma vez *B. subtilis* e *B. licheniformis* são aeróbicas facultativas (Clement et al., 2002), e após esses compostos serem degradados em partículas menores, a assimilação intracelular pode ser medida através da presença de oxigênio ou sua ausência no meio. Para verificar a taxa de consumo de oxigênio do sedimento (TCO), pode ser utilizada a análise de respirometria do sedimento, que permite a medição e interpretação da (TCO) em sistemas aeróbios (FERNANDES et al. 2001).

Um dos métodos empregados para a verificação do papel dos microrganismos no sedimento, é a cromatografia circular de Pfeiffer, que consiste em uma análise qualitativa da vida no sedimento, vitalidade e equilíbrio dos diferentes componentes que contribuem para a formação e estabilização do sedimento. (PINHEIRO, 2011).

Dessa forma o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações e periodicidades de aplicação de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* sobre os teores de matéria orgânica em sedimento de tanques de carcinicultura intensiva, além de analisar a alteração da comunidade bacteriana.

1.1 HIPÓTESE

A aplicação das bactérias *Bacillus subtilis* e *B.licheniformis* em amostras de sedimento de viveiro de carcinicultura, será capaz de reduzir a matéria orgânica, e modular beneficemente a comunidade microbiana.

1.2 OBJETIVOS

1.3 Objetivo Geral

Contribuir com conhecimento sobre a utilização de bactérias *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* para melhoria da qualidade do sedimento em viveiros de carcinicultura intensiva.

1.4 Objetivos Específicos

Avaliar as alterações na qualidade do sedimento de viveiros de carcinicultura com a adição de *Bacillus subtilis* e *B.licheniformis* em diferentes concentrações e periodicidades.

Avaliar a capacidade de remoção matéria orgânica do sedimento de viveiros de carcinicultura com a adição de *Bacillus subtilis* e *B.licheniformis* em diferentes concentrações e periodicidades.

Verificar as alterações da comunidade bacteriana presente no sedimento do viveiro, com a adição de *Bacillus subtilis* e *B.licheniformis* em diferentes concentrações e periodicidades.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e material biológico

As amostras de sedimento foram coletadas da fazenda Quality camarões com produção comercial, situada na vila da glória, São Francisco do Sul, latitude 26°14'36" Sul e a uma longitude 48°38'17" Oeste, estado de Santa Catarina, ao final do período de um ciclo de cultivo de camarão (*Litopenaeus vannamei*). As amostras foram coletadas na região do viveiro que apresentou maior concentração de matéria orgânica, logo após a despesca, com o sedimento ainda úmido, seguindo metodologia em ziguezague pelo viveiro (Embrapa). Para tal foi retirada uma camada de aproximadamente 20 cm de sedimento, até completar o volume de aproximadamente 250 L, sem descartar nenhuma fração da amostra.

Já o experimento foi realizado no Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), as análises de sedimento foram realizadas no Laboratório de Classificação e Manejo de Sedimentos (CMS) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a supervisão do professor Arcângelo Loss.

O biorremediador PureGro®, fabricado pela empresa DSM Nutritional Products Inc. com sede na Holanda, aprovado pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA-Q-2015-00164) e registrado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento sob o número SP-0350930374 foi cedido para a realização do ensaio. De acordo com o fabricante o produto contém óleo mineral, casca de arroz, carbonato de

cálcio e as bactérias probióticas *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, na concentração mínima de $0,5 \times 10^9$ UFC g⁻¹ de cada bactéria.

2.2 Delineamento experimental

O sedimento coletado da fazenda, foi homogeneizado e transferido aleatoriamente para as unidades experimentais. Os grupos avaliados foram, sedimento sem adição de microrganismos (controle), sedimento que recebeu adição de 150g por hectares a cada 3 dias (P150-3), sedimento que recebeu adição de 150g por hectares a cada 6 dias (P150-6), adição de 300g por hectare a cada 3 dias (P300-3) e adição de 300g por hectare a cada 6 dias (P300-6), ou seja cinco grupos com cinco repetições cada, totalizando 25 unidades experimentais. As unidades experimentais utilizadas foram caixas plásticas retangulares, com área útil de 230cm². O ensaio teve duração de 15 dias. As coletas das amostras ocorrem no dia 0, no dia 3, 6, 9, 12 e 15 do experimento.

2.3 Preparo dos inóculos bacterianos.

O biorremediador PureGro[®], contendo os *Bacillus sp.* Foi inicialmente diluído em solução estéril (SSE) a 0.65%, e posteriormente ocorreu a aplicação manualmente espalhando do inóculo espalhando-o sobre as amostras de sedimento, nas concentrações (150 g.ha⁻¹ e 300 g.ha⁻¹). Sendo as aplicações do biorremediador ministradas a cada 3 ou 6 dias.

2.3.1 Análise de teor de carbono do sedimento.

No início e no fim do experimento, uma amostra de sedimento de aproximadamente 500g, foi homogeneizada, e seca em estufa a 60°C por 48h. Posteriormente, estas amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Classificação e Manejo de Sedimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram realizadas análises de teor de carbono, através do método de fracionamento físico da matéria orgânica, segundo Sohi et al. (2001), que foi adotado e adaptado na Embrapa Solos (Machado, 2002).

2.3.2 Cromatografia circular de Pfeiffer.

Foi realizada análise de cromatografia do sedimento, análise que leva o nome do químico alemão Ehrenfried Pfeiffer (1899 - 1961). Para sua realização foi necessário preparar previamente, placas de petri com o dobro do número de amostras, hidróxido de sódio 1% (NaOH) diluído em água destilada, nitrato de prata a 0.5% diluído em água destilada em vidro âmbar, pois essa substância é sensível a luz, medição e realização de três furos em um papel filtro circular de 9cm de diâmetro.

- 1º furo no centro com 2cm de diâmetro;
- 2º furo a 4cm do centro, furado com agulha de seringa;
- 3º furo a 6cm do centro, furado com agulha de seringa;

Preparar rolinhos de papel com o mesmo papel filtro (o dobro do número de amostras) para colocar no furo central para realização da impregnação.

Para a preparação do sedimento foi necessário pesar 5 g de sedimento de cada unidade experimental ao final do experimento, e diluir em 50 ml de NaOH a 1%. Após, foi homogeneizado os recipientes com a solução, sete vezes para um lado e sete para o outro lado. Posteriormente, a amostra permaneceu em repouso por 15 minutos, percorrido os 15 minutos de repouso as amostras foram homogeneizadas novamente da mesma maneira. Posteriormente as amostras descansarem por 1 hora. Percorrido a 1 hora de repouso, as amostras foram homogeneizadas novamente, em seguida permanecerem em repouso por mais 6 horas antes da análise.

A impregnação dos filtros com nitrato de prata 0.5% foi iniciada 2 horas após o início do último repouso do sedimento, o nitrato de prata foi colocado sob a placa de petri de forma a cobrir toda a superfície, em seguida o filtro com o rolinho de papel no furo central foi colocado sob a placa de petri contendo o nitrato de prata. A retirada do filtro correu quando o nitrato de prata alcançou o segundo furo (4cm), o filtro foi então colocado sob papel toalha e guardado em câmara escura de 4 a 3 horas, para secar.

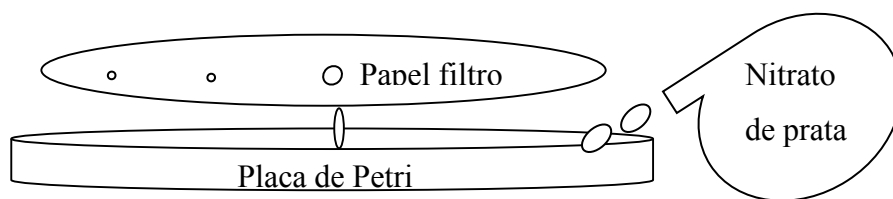


Figura 1 - Esquema da cromatografia de Pfeiffer.

Após o descanso de 6 horas da amostra de sedimento e das 4 horas do filtro já impregnado, iniciou-se a cromatografia do sedimento, com uma pipeta adicionou-se o sobrenadante da amostra de sedimento em uma placa de petri até cobrir o fundo, posteriormente, colocou-se o filtro com o rolinho de papel no furo central sobre a placa de petri contendo a mostra de sedimento diluída e descansada. A migração ocorre até o terceiro furo (6cm), entre 30 a 45 minutos, após esse procedimento as amostras devem ser retiradas e colocadas para secar. (Pilon, L. C.; Cardoso, J. H.; Medeiros, F. S, 2018).

2.3.3 Respirometria do sedimento

Análise de respirometria do sedimento, consiste na avaliação da quantidade de dióxido de carbono (CO_2) liberado pelo sedimento, a partir da atividade de microrganismos, pois durante seu processo de crescimento e degradação dos compostos presentes no sedimento ocorre a liberação de CO_2 . Portanto esta análise foi realizada segundo metodologia de Öhlinger (1993). Para isso, foram colocados pequenos potes de plástico transparente, contendo volume de 20mL de hidróxido de sódio (NaOH 0,5M), colocados sobre o sedimento das unidades experimentais, vedado com recipientes de plástico com diâmetro maior, para que o CO_2 produzido pelos microrganismos ficasse preso neste ambiente. A forma como foi disposta a montagem da estrutura para avaliação da respirometria pode ser observada na figura 2.



Figura 2 - Respirometria do sedimento, após adição do biorremediador nas concentrações de 150g por hectare e 300g por hectare, a cada três dias. Recipiente contendo hidróxido de sódio.
Fonte: Arquivo pessoal

Para imobilizar o CO_2 utilizou-se 1 mL de cloreto de bário (BaCl_2) imediatamente após a abertura do recipiente de plástico, para que a reação parasse de ocorrer. Logo após foi adicionado uma gota do indicador fenolftaleína a 1%. Para as titulações do NaOH não reagido com CO_2 , utilizou-se bureta com HCl 0,5M.

O valor gasto de mililitro na titulação, foi anotado para posteriores cálculos. O procedimento experimental foi complementado por prova em branco. A análise foi realizada a cada 3 dias, durante o experimento. Os dados obtidos foram expressos em $\text{C-CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$. Na figura 3, é possível observar a disposição das unidades experimentais durante a análise de respirometria.



Figura 3 - Disposição das unidades experimentais durante a análise de respirometria
Fonte: Arquivo pessoal.

2.3.4 Análise estatística.

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilkinson e Levene para verificar a normalidade e homocedasticidade das variâncias, respectivamente. Com os pressupostos garantidos os dados foram submetidos a análise de variância unifatorial (ANOVA) para o teor de Carbono e bifatorial (fator concentração e fator tempo) para respirometria. Quando observado diferença significativa as médias foram comparadas pelo teste de Duncan. Todos os testes atribui-se do o nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas através do software Statistic 10.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de teor de carbono do sedimento.

Com os resultados obtidos pode-se observar diferença significativa entre as doses e os dias de aplicação. Os valores de carbono no grupo controle diferiu-se significativamente do tratamento P150-3 e do tratamento P300-6, que também apresentaram diferença entre si. Já o grupo que recebeu P300-6 foi o que apresentou maior diminuição do teor de carbono, porém não diferiu significativamente do tratamento P300-3 e P150-3. Portanto, pode-se afirmar que a concentração de 300g por hectare do biorremediador *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* (PureGro®) aplicado a cada 6 dias demonstrou melhores resultados de redução da concentração de carbono em comparação ao grupo controle. Sendo assim, aplicações do bioremediador em viveiros escavados de carcinicultura, pode ocorrer, em intervalos de 6 dias, pois há diminuição maior de carbono do sedimento.

No entanto, deve-se levar em consideração que no sedimento dos viveiros já existem uma microbiota naturalmente que podem estar colaborando para a decomposição da matéria orgânica. Mas fica evidente com o presente estudo que a adição do biorremediador na maior concentração P300-6 promoveu possivelmente a elevação dessa da concentração de bactérias no sedimento o que contribui para acelerar o processo de estabilização do carbono.

Tabela 1 – Porcentagens de carbono, presentes no sedimento de viveiro de carcinicultura, após adição de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* em diferentes com concentrações e periodicidade. À saber: sem adição (controle); com adição de *B. subtilis* e *B. licheniformis* a 150 g ha⁻¹ aplicado a cada três dias (P150-3); com adição de *B. subtilis* e *B. licheniformis* a 150 g ha⁻¹ aplicado a cada seis dias (P150-6); com adição de *B. subtilis* e *B. licheniformis* a 300 g ha⁻¹ aplicado a cada três dias (P300-3); e com adição de *B. subtilis* e *B. licheniformis* a 300 g ha⁻¹ aplicado a cada seis dias (P300-6).

Tratamentos	Teor de carbono (%)
Controle	2.91 ± 2.87 0,10 ^{Ac}
P150-3	2.66 ± 2.80 0,33 ^{Aab}
P150-6	2.82 ± 2.95 0,24 ^{Abc}
P300-3	2.75 ± 2.79 0,31 ^{Aabc}
P300-6	2.63 ± 2.72 0,54 ^{Aa}

Letras iguais não apresentam diferença significativa. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre os dias de aplicação, e letras minúsculas apresentam diferença significativa entre as doses. Pelos testes de Shapiro-Wilkinson e Levene.

3.2 Cromatografia circular de Pfeiffer

A Cromatografia Circular Plana (CCP), é um método pouco propagado, mas que vem adquirindo espaço na agricultura, é um método de análise ampla e reinada que abrange fertilidade do sedimento, fatores físico químicos e da biologia do sedimento. Para realizar a interpretação do cromatograma, é necessário compará-lo com livros e bibliografias, por se tratar de uma análise qualitativa. Para interpretar a CCP, é preciso primeiro considerar que o solo é um organismo vivo (Primavesi, 1984), e como tal, apresenta fertilidade. Dessa forma sedimentos mais férteis têm a capacidade de favorecer o crescimento de biomassa microbiana, aumentar a gama genética dos organismos e microrganismos que reciclam a matéria orgânica.

A CCP propicia constatar como a vida está acontecendo no interior e sobre o sedimento. As substâncias presentes no sedimento, são retiradas pela solução de NaOH (1,0%). De maneira uniforme essas substâncias se distribuem sobre o papel filtro impregnado com nitrato de prata AgNO₃ (0,5%), que é um revelador aplicado para colorir

substâncias complexas, reagindo também com a totalidade dos elementos existentes no sedimento de maneira quantitativa (PINHEIRO, 2011).

Após impregnação e secagem ocorre a formação de halos sequenciais que, possibilita ao olho humano reconhecer padrões de cores e arranjos que revelam a disponibilidade e eficiência dos componentes que integram o sedimento. A imagem é fragmentada em zonas (Figura 4), nas quais é possível realizar a sua caracterização, e assimilação da integração entre estas. A interpretação ocorre a partir das tonalidades de cores, espessuras e modelos das linhas em cada zona, e da integração (PILON et al., 2018).

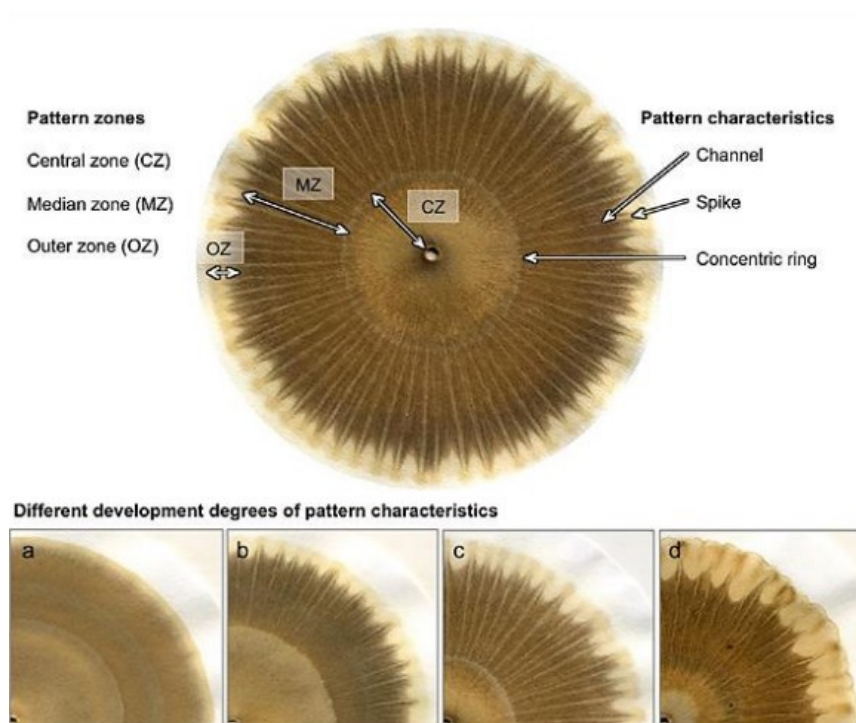


Figura 4 - Diferenciação entre as zonas do cromograma.
Fonte: Kokornaczyk et al. (2016)

A complexidade e regularidade desses padrões são consideradas indicadores de qualidade, assim como a formação de padrões irregulares são relacionados a amostras de baixa qualidade (Kokornaczyk et al., 2012). Dessa forma podem ser verificadas informações a respeito dos processos físicos, químicos e biológicos do sedimento.

O grau crescente de intensidade de cor indica a indisponibilidade nutricional, do húmus permanente, da diversidade mineral, da atividade biológica e da integração entre zonas (Ribeiro, 2016). A intensidade da cor varia conforme a reação do hidróxido de sódio (NaOH) 1% com as seguintes substâncias N/NH₃/NO₂/NO₃ e as cores variam de

acordo com a presença do oxigênio (ascendência oxidante) e enxofre (ascendência redutora) estes no momento da coleta (Restrepo, 2014)

Quanto à coloração, os tons escuros indicam o mínimo metabolismo microbiano aeróbico e máxima fermentação anaeróbica. A cor branca indica a reação do AgNO_3 com a presença de estruturas nitrogenadas. A cor creme indica a maior plenitude do metabolismo microbiano, enzimático e ação benéfica aos sedimentos (Restrepo, 2014).

A zona central (ZC) apresenta, uma área específica muito pequena e com coloração escura, pouco se diferenciando da zona posterior. Esses elementos citados não são desejáveis na composição da imagem do cromatograma, para sedimentos provenientes de agricultura (Restrepo & Pinheiro, 2011). Essa característica indica um sedimento com pouca estruturação, com dificuldade na troca de gases e o desenvolvimento da biota (Miranda et al., 2017).

A análise dos cromatogramas das diferentes amostras de sedimento avaliadas (Figuras de 5 a 9) possibilitou verificar que houve diferenças entre os padrões de formação dos cromas. Na zona central, por exemplo, representa o metabolismo primário do sedimento, no qual foi possível observar a cor marrom enegrecida, em todos os grupos experimentais. Esta coloração indica que o sedimento estava compacto e asfocado, devido ao mínimo ciclo do enxofre existente.

Já na zona intermediária (ZI), onde ocorre a predominância e potência dos minerais disponíveis, não foi possível observar diferença evidente entre os cromas nesta zona. A zona externa (ZE) é considerada a zona proteica e enzimática, que representa o metabolismo secundário, imprime o resultado da degradação protéica. Tons mais claros nestas zonas estão associados a sedimentos de maior qualidade e dominados por processos aeróbicos (Follador, 2015; Pilon et al., 2018), esse aumento da atividade aeróbica é observado através do aumento da (ZE) nos cromas dos tratamentos P300-3 e P300-6. (Figura 5).

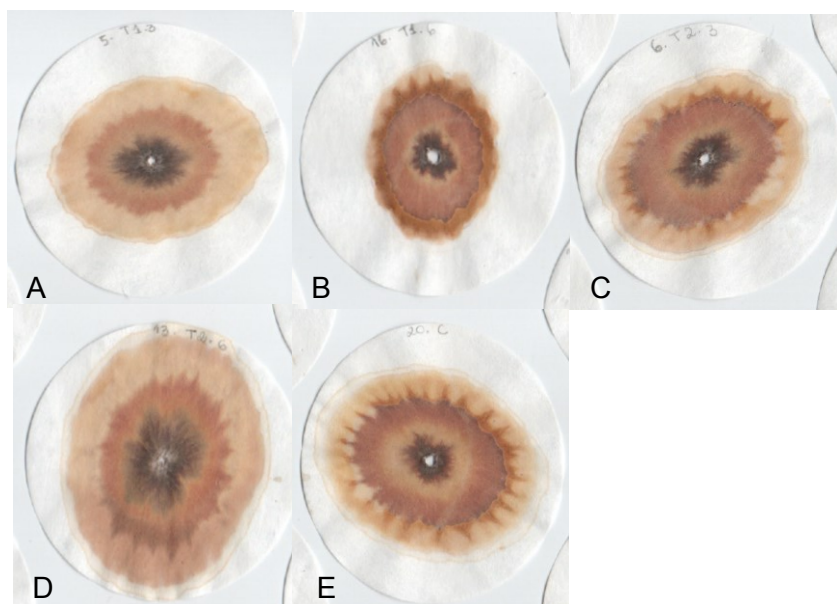


Figura 5 – Análise de cromatografia de Pfeiffer de sedimento de viveiro de carcinicultura após adição de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* em diferentes concentrações e periodicidade. À saber: sem adição (controle) letra E; com adição de *B. acillus subtilis* e *B. licheniformis* a 150 g ha⁻¹ aplicado a cada três dias P150-3, letra A; com adição de *B. subtilis* e *B. licheniformis* a 150 g ha⁻¹ aplicado a cada seis dias P150-6, letra B, com adição de *B. subtilis* e *B. licheniformis* a 300 g ha⁻¹ aplicado a cada três dias P300-3, letra C e com adição de *B. subtilis* e *B. licheniformis* a 300 g ha⁻¹ aplicado a cada seis dias P300-6, letra D.

3.2.1 Interpretação química da cromatografia.

Na zona central, quando a solução de hidróxido de sódio (NaOH), carregando as substâncias, minerais ou orgânicas dissolvidas, passam pelo papel impregnado com nitrato de prata, há a formação imediata de hidróxido de prata (AgOH), uma substância instável que, rapidamente forma um precipitado escuro de óxido de prata (Ag₂O) proporcional à quantidade da substância. Se o sedimento não apresenta metabolismo aeróbico, ou seja, quando os microrganismos aeróbicos sucumbem em favor dos anaeróbicos, acumulam-se substâncias tóxicas na atmosfera do sedimento (metano, amoníaco, fosfina, gás sulfídrico, borano) não há atividade de oxidação de minerais, ação fermentativa ou respiratória, sendo assim a cor é escura ou preta (Pinheiro, 2011). Essa cor escura está presente na ZC de todos os cromas analisados no presente estudo (Figura 5).

Na zona intermediária, o hidróxido de sódio reage especificamente com minerais metabolizados pelos microrganismos (mineral das enzimas, mineral das vitaminas e proteínas) de forma diferente dos minerais solúveis e insolúveis fora do metabolismo ou

bioplasma. Sua composição, grau de oxidação, redução determinam a forma, cor, desenvolvimento, integração e distância desde a zona central à periférica. Em química analítica sabe-se que as cores escuras, negras, cinzentas, castanhas e violáceas são reações predominantes de sulfetos e pouca oxigenação. Os “minerais-vivos” são dotados de carga elétrica e magnetismo. Nesta região se observa uma grande quantidade de minúsculas “pontas de flechas”, superpostas desde a zona central em direção à extremidade da zona externa. Quanto maior diversidade e harmonia nesta zona e integração com as outras, maior é a saúde e qualidade de vida neste sedimento (PINHEIRO, 2011). A presença de “pontas de flechas” apresenta-se mais evidente da zona intermediária em direção à zona externa, nos tratamentos P150-3, P300-3 e P300-6 diferenciando do padrão formado na cromia do controle (Figura 5).

Após ultrapassar a zona impregnada com prata, a solução alcalina desloca-se sobre o papel filtro para formar a zona externa. Nesta zona pode-se ver a parte das substâncias complexas de alto peso molecular (proteínas, vitaminas, enzimas) ativas do sedimento formadas pela ação dos microrganismos ativados na matéria orgânica de forma integrada. A fração nitrogenada, peptídico, proteica passa pelo centro e zona intermediária e reage com os restos de prata livres para formar complexos como as denominadas “pétalas”, “nuvens” e “dentes de cavalos”, “linhas” e “ondas” de cor prateada sobre um fundo castanho claro. Pode-se observar nesta zona, a biodiversidade microbiana através de sua biossíntese proteica e polipeptídios solúveis da vida no sedimento. Quanto mais diversa for a vida no sedimento, maior a presença de membranas que ultrapassam a zona intermediária e chega a esta com picos diferentes e variados (Pinheiro, 2011).

O padrão de “dentes de cavalos” está presente nitidamente na (ZE) do tratamento controle, bem como a formação de “nuvens”. A formação de linhas, saindo da (ZI) em direção a (ZE) está presente com pouca intensidade no tratamento (P150-3), se mostrando mais intensas nos tratamentos (P300-3) e (P300-6), padrão de formação provenientes do aumento da ação dos microrganismos no sedimento.

A CCF apresentou-se aplicável e benéfica para a realização da pesquisa, mostrando que pode ser útil na avaliação do estados de sedimento dos tanques de carcinicultura. Este trabalho foi realizado com sedimento com alta carga de matéria orgânica, em comparação com a natureza dos sedimentos dos trabalhos na grande maioria da literatura, nos quais é empregada exclusivamente para sedimentos agrícolas (florestas, horticultura). Com os resultados obtidos acredita-se que a técnica pode ser

aperfeiçoada, e modificada. A metodologia pode ser alterada por conta das características dos sedimentos de carcinicultura, como a possível diminuição da porção de sedimento de 5g para 2,5g, para melhores resultados na abertura das zonas dos cromas, possibilitando uma melhor interpretação.

3.2.2 Respirometria do sedimento

A respirometria se trata da medição e interpretação da taxa de consumo de oxigênio (TCO) em sistemas aeróbios (Fernandes et al. 2001). A atividade dos microrganismos no sedimento foi avaliada através da liberação de dióxido de carbono (CO₂). Com os resultados obtidos pode-se observar diferença significativa entre as doses e as periodicidades de aplicação, podendo afirmar que a concentração de 300 g.ha⁻¹ a cada 3 dias demonstrou melhores resultados. Sendo assim, aplicações do bioremediador a base de *Bacillus sp* em viveiros escavados, deve ser realizada em intervalos de três dias, para garantir melhor eficácia de crescimento microbiano, conseqüentemente melhor degradação da matéria orgânica (Figura 10).

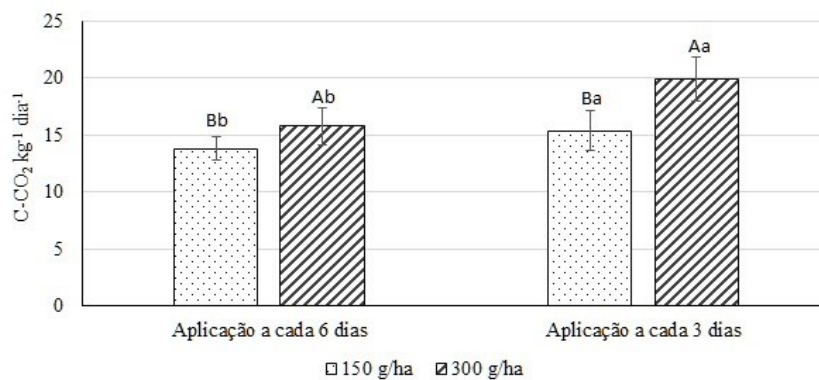


Figura 6 – Respirometria de sedimento proveniente de viveiros de carcinicultura, com adição ou não (controle) do biorremediador de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* nas concentrações de 150g ha⁻¹ e 300g ha⁻¹ aplicados a cada três ou seis dias. Letras minúsculas apresentaram diferença significativa entre os doses e letras maiúsculas entre as dias.

4 CONCLUSÃO

Tendo em vista a maior eficiência na redução de matéria orgânica, assim como os melhores resultados verificados no ensaio de respirometria do sedimento, e aumento da atividade dos microrganismo pela cromatografia de Pefeiffer, recomenda-se a utilização do biorremediador (PureGro[®]) composto de *B. subtilis* e *B. licheniformis* na concentração de 300 g por hectare, aplicado a cada três dias.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A CCF, é aplicada para a verificação do estado do sedimento, no entanto mais estudos são necessários para a melhor utilização da cromatografia de Pfeiffer aplicada a sedimentos provenientes de viveiros de carcinicultura.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. C. D.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O. (2016). **Atividade microbiana em sedimentos sob doses de lodo de estação de tratamento de efluentes de um aterro industrial**. *Ciência Rural*, 2016, 46.2: 267-272.
- BARROS, F. F. C., et al. **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos**. *Química Nova*, 2007, 30.2: 409-414.
- BEVERIDGE, M.C.M.; PHILLIPS, M.J.; CLARKE, R.M. 1991 **A quantitative and qualitative assessment of wastes from aquatic animal production**. In: BRUNE, D.E. e TOMASSO, J.R. (eds.) *Aquaculture and water quality*, Clemson University, USA. p.506-533.
- BOYD, C.E. 1986 **Comments on the development of techniques for management of environmental quality in aquaculture**. *Aquacultural Engineering*, London. 5: 135-146.
- BOYD, C.E. e QUEIROZ, J. 1997 **Manejo do sedimento e da qualidade da água em viveiro para aquicultura**. Trad. Eduardo Ono. Campinas: ASA. *Pond Bottom Soil and Water Quality Management for Pond Aquaculture*. 55p.
- BURLE, Eduardo Costa; FIGUEIREDO, Renan Tavares. **Uso da Cromatografia Circular Plana em diferentes concentrações para análise de sedimento e de compostos orgânicos**. *Caderno de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas-UNIT-SERGIPE*, 2019, 5.2: 19.
- DATTA, S. e JANA, B.B. 1998 **Control of bloom in a tropical Lake: grazing efficiency of some herbivorous fishes**. *Journal of Fish Biology*, United Kingdom, 53: 12-34.
- DONAGEMA, G. K.; CAMPOS, D. V. B. de; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA, J. H. M. (Org.). **Manual de métodos de análise de sedimentos**. Rio de Janeiro: Embrapa Sedimentos, 2011. (Embrapa Sedimentos. Documentos, 132).
- ESTEVES, F.A. 1998 **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência. 575p.
- GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. **Biorremediação**. *Biotechnology Ciência & Desenvolvimento*, 2005, 34: 36-43.
- JOAO GATICA & EDDIE CYTRYN. **Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in the soil microbiome**. *Environ Sci Pollut Res* (2013) 20:3529–3538.
- MACEDO, C.F. E SIPAÚBA-TAVARES, L. H. 2010. **Eutrofização e qualidade da água na piscicultura: consequências e recomendações**. *Bol. Inst. Pesca*, São Paulo, 36(2): 149 – 163.

MAGALHÃES, M. S. E. **Cultivo de Litopenaeus vannamei (BOONE, 1931) em sistema multifásico**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2004. 60 p.

MATSUOKA, M.; MENDES, I. C.; LOUREIRO, M. F. **Biomassa microbiana e atividade enzimática em sedimentos sob vegetação nativa e sistemas agrícolas anuais e perenes na região de Primavera do Leste (MT)**. Revista Brasileira de Ciência do Sedimento, 2003, 27.3: 425-433.

MERCANTE, C.T.J; CABIANCA, M.A; SILVA, V; COSTA, S.V.; ESTEVES, K.E. 2004 **Water quality in fee-fishing ponds located in the São Paulo metropolitan region, Brazil: analysis of the eutrophication process**. Acta Limnologica Brasiliensia, Botucatu, 16(1): 95-102.

MERCANTE, C.T.J.; MARTINS, Y.K.; CARMO, C.F.; OSTI, J.S.; MAINARDES PINTO, C.S.R.; TUCCI, A. 2007 **Qualidade de água em viveiro de Tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus): caracterização diurna de variáveis físicas, químicas e biológicas**. São Paulo, Brasil. Bioikos, Campinas, 21(2): 79-88.

MITCHELL, A.J. 1996 **Blue-green algae**. Aquaculture Magazine, Asheville, 2: 79-83.

OLIVEIRA, Walter Santos, et al. **Métodos de interpretação para teste de qualidade em sedimentos a partir da Cromatografia Circular Plana (FCC)**. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, 2020, 3.3: 1107-1125.

PEREIRA, A. R. B., & de FREITAS, D. A. F. (2012). **Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, 6(6), 995-1006.

PERSCHBACHER, P.W.; MILLER, D.; CONTE, E.D. 1996 **Algal off-flavors in reservoirs**. American Fisheries Society Symposium, USA, 16: 67-72.

PEÑA, M. L. P., MARQUES, R., JAHNEL, M. C., & DOS ANJOS, A. (2005). **Respiração microbiana como indicador da qualidade do sedimento em ecossistema florestal**. Floresta, 35(1).

PINHEIRO, S. **Cartilha da saúde do sedimento (cromatografia de Pfeiffer)**. Porto Alegre: Salles, 2011. 120 p.

RIVERA, J. R.; PINHEIRO, S. **Cromatografía: Imágenes de vida y destrucción del suelo**. Cali: Feriva, 2011. 252 p.

ROBINSON, G. et al. **Profiling bacterial communities associated with sediment-based aquaculture bioremediation systems under contrasting redox regimes**. Sci. Rep. 6, 38850; doi: 10.1038/srep38850 (2016).

TALBOT, C. e HOLE, R. 1994 **Fish diets and the control of eutrophication resulting from aquaculture**. Journal of Applied Ichthyology. Germany, 10: 258-270.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de sedimento, plantas e outros materiais. 2.ed.** Porto Alegre, Departamento de Sedimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995. 174p.

THONTON, K.W; KIMMEL, B.L.; PAYNE, F.E. 1990 **Reservoir limnology: ecological perspectives.** John Wiley e Sons, New York. 256p.

WUBS, ER J., et al. **Single introductions of soil biota and plants generate long-term legacies in soil and plant community assembly.** Ecology letters, 2019, 22.7: 1145-1151.