



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Biorremediação: alternativa para controle de sólidos no cultivo
superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com bioflocos com
troca zero de água

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Aquicultura da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. Walter Quadros Seiffert
Co-orientador: Profa. Dra. Katt Regina Lapa

Helena Ragibo Salência

Florianópolis
2011

Catalogação na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

S163b Salência, Helena Ragibo
Biorremediação [dissertação] : alternativa para controle de sólidos no cultivo superintensivo de litopenaeus vannamei com bioflocos com troca zero de água / Helena Ragibo Salência ; orientador, Walter Quadros Seiffert. - Florianópolis, SC, 2011.
64 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Bioacumulação. 3. Matéria orgânica. 4. Litopenaeus vannamei. 5. Camarão marinho. I. Seiffert, Walter Quadros. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Biorremediação: alternativa para controle de sólidos no cultivo
superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com bioflocos com troca
zero de água**

Por

HELENA RAGIBO SALÊNCIA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Walter Quadros Seiffert – *Orientador*

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño

Dr. Luis Hamilton Pospissil Garbossa

À mana Raquel José Salência, que Deus a tenha.
À minha mãe Juliana Ragibo & ao meu pai José Salência.
À Janira de Salência Mucufo, minha filha.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Internacional de Bolsas de Estudo da Fundação Ford por conceder a bolsa de estudos e ao “The Africa-America Institute”, instituição que coordena as bolsas da Fundação Ford em Moçambique, pela confiança depositada.

Ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC pela admissão.

Ao Laboratório de Camarões Marinhos por acolher a realização de trabalho e por conceder auxílio alojamento durante a vigência dos estudos.

Ao Ministério das Pescas em Moçambique por me conceder a licença para formação e pelo encorajamento.

À empresa Comambio Comam-Comércio e Biorremediação Ltda pela colaboração e pelo auxílio financeiro para realização das análises de qualidade de água.

Ao José Luíz Mouriño pelo apoio, paciência e por saber gerir todas as nossas diferenças sócio-culturais tornando este trabalho uma realidade.

Ao professor Walter Quadros Seifertt por ter apostado em mim, pela orientação e contribuições valiosas e à professora Katt Regina Lapa pelas contribuições valiosas e disponibilidade que sempre ofereceu para o desenvolvimento do trabalho, pela co-orientação e pela amizade.

Ao doutorando Rafael Arantes pela disponibilidade e pelo apoio prestado para concretização deste trabalho e ao Rodrigo pelas dicas durante o planejamento experimental

À minha mãe Juliana Ragibo e ao meu pai José Salência pela compreensão e delicadeza, pelo todo apoio moral e psicológico prestado durante a formação e por terem acreditado nos meus sonhos.

Ao meu esposo pelo amor e carinho, confiança e paciência. Jaibo, esse trabalho também ti pertence. Às minhas irmãs: Clara, Eugénia, Josefina, Julia (Taty), Judite e Sofia e aos meus: irmãos Celestino e Djadje. Obrigado pela confiança, amor e carinho.

Às minhas sobrinhas queridas Dady, Cyntia, Suzi, Salomé, Misleide, Enny e Winy. E ao Ju pelo sorriso maravilhoso que souberam oferecer com muito afeto.

Ao Biólogo Carlos Espírito Santo do Laboratório de Qualidade de água pela paciência e disponibilidade no apoio das análises de água. Ao Marcos Blum e Marcos Santiago pelo apoio na instalação das unidades experimentais e execução do trabalho e a Marcela Uberty pelo apoio na execução das análises de qualidade de água.

Ao Carlitos da secretaria de PGAQI pela atenção e paciência.

Ao Filipe Viera do LCM pela disponibilidade e pela atenção e aos colegas do Laboratório de Microbiologia pela ajuda na realização das análises de microbiologia.

Aos amigos Manecas Baloi, Joel Fernandes, Afonso Macheça, Ewdumar Quintino que estiveram sempre presentes nos bons e perturbados momentos da minha formação.

À Genyess e a Domingas pelo carinho, amizade, confiança e partilha e ao Robson Pereira amigo de verdade.

Ao pessoal de apoio do LCM pela ajuda e amizade.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a execução e realização deste trabalho.

“Quando estiver buscando novas informações seja explorador; Quando estiver transformando os recursos em novas idéias seja um artista; Quando estiver avaliando os méritos de uma idéia seja um juiz; e Quando estiver colocando uma idéia em pratica seja um Guerreiro”.

Von dech (1986)

RESUMO

Devido ao elevado volume de sólidos que se acumula dentro dos tanques de cultivo superintensivo de camarões com bioflocos microbianos há necessidade de maior cuidado no manejo das variáveis de qualidade de água de modo a favorecer o crescimento dos camarões no cultivo. Este trabalho foi realizado com objetivo de avaliar o efeito de um produto comercialmente utilizado em tratamento de efluentes domésticos sobre os parâmetros zootécnicos de camarões marinhos e variáveis físicas químicas de qualidade de água em cultivo superintensivo com bioflocos microbianos. O efeito de Comambio[®] foi testado sobre a interação com camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei*, cultivados em sistema superintensivo com bioflocos e sobre as variáveis físicas químicas de qualidade de água de cultivo. O estudo consistiu em três ensaios distintos. No primeiro ensaio determinou-se a concentração de Comambio[®] adequada para biorremediação em cultivo de camarões testando ao acaso oito diferentes concentrações do Comambio[®] em quatro repetições sobre sólidos sedimentáveis em água retirada de cultivo superintensivo com bioflocos microbianos. No segundo testou-se a utilização do biorremediador em diferentes frequências de aplicação, semanal e quinzenal, comparada a um controle, sem adição de produto sobre os parâmetros zootécnicos dos camarões em cultivo superintensivo com bioflocos utilizando camarões marinhos com peso inicial de 1,66 g estocados a 3 gL⁻¹. No terceiro ensaio fez-se a caracterização dos parâmetros físicos e químicos de qualidade de água em dois tratamentos; com biorremediador (Comambio[®]) e sem aplicação (Controle) em tanques de 900 L estocados inicialmente com peso médio 20,62±0,39 g a uma densidade de 120 camarões/m³. A utilização do biorremediador não apresentou efeito nocivo aos animais cultivados. Sua adição no cultivo aumentou (p<0,05) em 46,76% a taxa de crescimento, 17,0% da biomassa final e 10,23% de sobrevivência em relação ao tratamento controle. Houve redução de 63,4 % no volume de sólidos sedimentáveis (SSed) com adição do Comambio[®] e os sólidos suspensos totais (SST) aumentaram devido a entrada de sólidos suspensos fixos (SSF) através da adição do produto. Entretanto, os dados da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) no final do cultivo apontam para significativamente inferior (p<0,05) no tratamento com biorremediador, 70,2% e 17,4% de variação Comambio[®] e controle respectivamente, sugerindo redução da fração orgânica. O biorremediador testado apresentou efeito imediato na redução do volume de sólidos sedimentáveis, e os efeitos da sua

utilização contínua sobre as características da comunidade microbiana presente na água de cultivo deverão ser estudados, uma vez que contribuiu de forma significativa para o crescimento, redução da conversão alimentar, sobrevivência e da biomassa final dos camarões cultivados.

Palavras-chave: biorremediação, bioflocos, efluente, matéria orgânica, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

Due to the high volume of solids that accumulate in the tanks of super intensive cultivation of shrimp farming with microbial bioflocs need for greater care in the management of water quality variables in order to promote the growth of shrimp cultivation. This work was carried out to evaluate the effect of a commercial product used in the treatment of domestic sewage on the zootechnical parameters of marine shrimp and variable physical and chemical quality of water in super intensive cultivation with microbial bioflocs. The effect of Comambio[®] was tested for interaction with marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultured in super intensive system with bioflocos physical and chemical variables on the quality of water for cultivation. The study consisted of three separate trials. In the first trial determined the concentration of Comambio[®] suitable for bioremediation in shrimp farms randomly testing eight different concentrations of Comambio[®] in four replicates on settling solids in water withdrawal super intensive cultivation with microbial bioflocos. In the second tested the use of bioremediator agente at different frequencies of application, weekly and fortnightly, compared to a control without addition of chemical on zootechnical parameters of super intensive shrimp farming in marine shrimp using microbial bioflocs with an initial weight of 1.66 grams stored at-a 3g/L. In the third trial was made to characterize the physical and chemical parameters of water quality in both treatments, with bioremediator agent (Comambio[®]) and no application (Control) in 900 L tanks stocked initially with average weight 20.62 ± 0.39 a density of 120 g shrimp.m^3 . The use of bioremediator showed no harmful effects to animals grown. Its addition in the cultivation increased ($p < 0.05$) in 46.76% growth rate, 17.0% of final biomass and 10.23% survival compared to control. There was a reduction of 63.4% in the volume of settleable solids (ssed) with the addition of Comambio[®] and total suspended solids (TSS) due to increased input fixed suspended solids (FSS) by adding the product. However, the data of biochemical oxygen demand (BOD) at the end of the growing point to significantly lower ($p < 0.05$) in the treatment bioremediate, 70.2% and 17.4% of variation Comambio[®] and control respectively, suggested reduction of the organic fraction. The bioremediate tested had an immediate effect in reducing the volume of settleable solids, and the effects of continuous use on the characteristics of the microbial community present in the water culture should be studied, since it contributed significantly to growth, reduction of the conversion food, survival and final biomass of farmed shrimp.

Keywords: Bioremediation, bioflocs, wastewater, organic matter, *Litopenaeus vannamei*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Variação de sólidos sedimentáveis (SSed) na água retirada de cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com biofoco em função da concentração de Comambio® 96 horas após a aplicação. Linha (-) é a reta da regressão linear segundo a equação $Y = -3.3439x + 8.8982$; $R^2 = 0.889$, $p < 0.01$. E “Z” é linha de referência que corresponde ao extremo inferior do intervalo de confiança da média do controle a 5% de confiança. Valores de SSed abaixo da linha de referência são estatisticamente inferiores que o grupo controle ($p < 0,05$).....40
- Figura 2:** Efeito de Comambio® no volume de sólidos sedimentáveis (SSed) (média± desvio padrão) durante o cultivo de matrizes de *Litopenaeus vannamei* em sistema superintensivo com troca zero de água. (*) simboliza média estatisticamente diferente. Linha () é referente a aplicação do biorremediador ($p < 0,05$).46
- Figura 3:** Dados da Demanda Bioquímica de Oxigênio (média±desvio padrão) no cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com biofoco microbiano com biorremediação e sem biorremediação no início e no final o cultivo. (*) simboliza diferença estatística ($p < 0,05$).....47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Efeito da frequência de aplicação semanal e quinzenal de Comambio[®] sobre os índices zootécnicos (média±desvio padrão) de *Litopenaeus vannamei* em sistema de cultivo superintensivo com bioflocos microbianos.42
- Tabela 2:** Índices zootécnicos (média±desvio padrão) no cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei*, com bioflocos microbiano com aplicação de biorremediador (Comambio[®]) e sem biorremediador (Controle).42
- Tabela 3:** Características físico-químicas da água (média±desvio padrão) durante o período experimental de cultivo superintensivo de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei* com bioflocos microbiano com aplicação de biorremediador (Comambio[®]) e sem biorremediador (Controle). Os dados na semana 0, correspondem a análises realizadas nos dois tratamentos no início do experimento.45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCO₃ – Carbonato de cálcio
cm – Centímetros
FAO – *Food and agriculture organization* (Organização para Alimentação e Agricultura)
g.L⁻¹ – Gramas por litro
mg.L⁻¹ – Miligramas por litro
mL.L⁻¹ – Mililitros por litro
NH₃-N – Amônia total
NO₂-N – Nitrito total
NO₃-N – Nitrato total
pH – Potencial hidrogeniônico
PO₄ – Fosfatos
ppt – Partes por mil
SSF – Sólidos suspensos fixos
SST – Sólidos suspensos totais
SSV – Sólidos suspensos voláteis
SSed – Sólidos sedimentáveis
COT – Carbono orgânico total
TSA – *Tryptic soy tooltip agar* (agar triptona de soja)
UFC.mL⁻¹ – Unidade formadora de colônias por millitros
W – Watts

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
a. Reciclagem de nutrientes e a decomposição de material orgânico.....	24
b. Bioaumentação em aquicultura.....	25
c. Produtos comerciais para uso em aquicultura	27
ARTIGO CIENTIFICO.....	29
Resumo	30
Abstract.....	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1. Material biológico.....	33
2.2. Delineamento Experimental.....	34
2.3. Métodos Analíticos	36
3. RESULTADOS	39
3.1. Características do produto Comambio®	39
3.2. Determinação de dose	39
3.3. Frequência de aplicação e desempenho zootécnico	40
3.4. Caracterização das variáveis físicas químicas do sistema de bioflocos tratados com Comambio®	43
4. DISCUSSÃO	47
5. Agradecimentos	53
6. Referências.....	53
Referências bibliográficas da introdução da dissertação.....	58

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da aquicultura no mundo é impulsionado como resposta ao consumo e a necessidade da melhoria da segurança alimentar. Com crescimento do consumo per capita de 0,7 kg, em 1970, para 7,8 kg, em 2008, a uma taxa de crescimento médio de 6,7 %, espera-se que a indústria aquícola continue a crescer, devido ao crescimento populacional. O consumo per capita de frutos do mar aumenta enquanto outras fontes de proteína reduzem (FAO, 2008). A redução de níveis de captura na pesca extrativa como consequência da pressão pelos recursos e mudanças climáticas, exige da aquicultura maior esforço e criatividade para responder a necessidade de produção de alimento. Este crescimento contribui para o uso de práticas de cultivos mais intensivas na produção aquícola. Práticas para contornar fatores limitantes como água de qualidade, custo da terra, limitações em descarga da água, e doenças, influenciam o desenvolvimento da aquicultura orientada para cultivos de maior intensidade (NACA/FAO, 2001; GUETIERREZ – WING, 2006).

O cultivo superintensivo de camarões é uma resposta à necessidade de aumento de produção em situação de escassez de água e redução de custos com ração e mão-de-obra. A tecnologia de cultivo com biofloco consiste na suspensão e retenção de resíduos como sobras de ração, fezes dos animais dentro do cultivo e invertebrados mortos e sua conversão em biofloco microbiano como alimento natural dentro do cultivo. A aeração constante da coluna de água e adição de fontes de carbono, como suporte para permitir a decomposição aeróbia e manter o alto nível de floco microbiano em suspensão, permite o estabelecimento dos agregados chamados biofloco microbiano (AVNIMELECH et al., 1992; HARVEGREVES, 2006; AVNIMELECH, 2006; 2007).

No cultivo superintensivo com biofloco microbiano a produção primária é garantida por bactérias heterotróficas que utilizam o carbono orgânico como fonte de energia, em crescimento consorciado com algas dentro de tanques de cultivo com características hidrodinâmicas que favorecem a mistura e a suspensão dos restos de alimento, fezes dos animais, animais mortos e outro material sólido dentro do cultivo. Este conceito está baseado no conhecimento prévio de sistemas de tratamento de efluentes do tipo lodos ativados, no qual o crescimento intensivo de bactérias que utilizam carbono orgânico no seu metabolismo é favorecido.

O carbono orgânico consumido (1 g) produz cerca de 0,4 g de peso seco de bactérias e depende da relação carbono/nitrogênio (C:N)

pela imobilização de nitrogênio mineral presente no sistema. A degradação microbiana de material orgânico no sistema conduz a produção de novas bactérias a partir de 40 a 60% da matéria orgânica metabolizada favorecendo assim a formação do equilíbrio do sistema de cultivo super-intensivo com biofoco microbiano (AVNIMELECH, 1999).

a. Reciclagem de nutrientes e a decomposição de material orgânico

Em sistemas de cultivos aquícolas fechados, à absorção de nitrogênio pelas microalgas e a nitrificação por bactérias nitrificantes são os principais processos de reciclagem de nitrogênio. No sistema heterotrófico, ocorre a imobilização de nitrogênio amoniacal pelas bactérias como fonte de nitrogênio para crescimento da biomassa bacteriana (HARGREAVES, 1998).

Nestes sistemas, a degradação microbiana de resíduos orgânicos controla em grande parte a qualidade de água (BURFORD et al., 2003 e BROWDY et al., 2001). Entretanto, em altas densidades de cultivo a coluna de água normalmente tem capacidade limitada de auto-depuração. Para melhorar a capacidade de auto-depuração de água, utiliza-se aporte externo de micro-organismos que podem-se tornar benéficos ao sistema, melhorando a qualidade da água (ZHOU et al., 2009). A introdução de micro-organismos biorremediadores na água de cultivo de organismos aquáticos pode aumentar a velocidade da decomposição da matéria orgânica pelos decompositores, fungos e bactérias; além de manterem o balanço da dinâmica ecológica entre os organismos e o equilíbrio ecológico na água, voltando a promover um ambiente favorável para o crescimento da espécie foco do cultivo (MORIARTY, 1997; 1998; ZHOU et al., 2009; JANEIO et al., 2010)

Decompositores heterotróficos favorecem a reciclagem de nitrogênio e fósforo para estimular a produção primária. Para ocorrer essa reciclagem e disponibilização de nutrientes no meio, pode-se adicionar micro-organismos essenciais a decomposição da matéria orgânica. A taxa de decomposição de material orgânico é influenciada pela natureza do detrito, termo usado em ecologia aquática para designar matéria orgânica morta o qual corresponde entre 5 e 10% da biomassa microbiana, atividade microbiana e do ambiente físico (MORIARTY, 1997).

b. Bioaumentação em aquicultura

Bioaumentação é uma técnica de biorremediação que consiste na introdução de micro-organismos em uma comunidade microbiana em ambientes fortemente contaminados para efeitos de acelerar a remoção e a biodegradação de um contaminante indesejável (JIAO et al., 2010). A utilização da bioaumentação para remediação torna-se cada vez mais comum em aquicultura. Tal comunidade microbiana introduzida para biorremediação pode ser autóctones, alóctones, geneticamente modificadas ou seus metabólitos (JIAO et al., 2010).

O sucesso da bioaumentação é conseguido com a utilização de bactérias com certas especificidades como nitrificação, decomposição da matéria orgânica, absorção de um contaminante específico. Tais bactérias possuem a capacidade de imobilizar nitrogênio inorgânico durante as suas atividades metabólicas. Por exemplo, a bioaumentação é utilizada para tratamento de águas residuárias com excesso de nitrogênio (MORIARTY, 1998; ZHOU et al., 2009; JIAO et al., 2010). Em aquicultura os micro-organismos também desempenham papel preponderante na medida em que ajustam a população de algas na água evitando problemas de *bloom* de algas. (MORIARTY, 1987; MORIARTY, 1998).

A ação microbiana no sistema aquático aumenta a velocidade da degradação/decomposição da matéria orgânica e promove a supressão de crescimento de patógenos de camarões e peixe na água de cultivo. Além disso, micro-organismos asseguram o sistema de animais aquáticos cultivados pela produção de compostos bioativos como hormônios, enzimas e vitaminas que estimulam o crescimento dos animais em cultivo (ZHOU et al., 2009). Fazem parte destes grupos bactérias e fungos que são decompositores da matéria orgânica. Micro-organismos benéficos são atualmente aplicados em aquicultura e maricultura em três formas diferentes nomeadamente cepas singulares, cepas múltiplas e cepas compostas com e sem aditivos. Estes organismos desempenham suas atividades através da regulação da microbiota (atividade microbiana), manutenção da eubiose, aumento do nível de saúde do hospedeiro e promoção de proliferação de micro-organismos benéficos e seus metabólitos na micro-ecologia. A outra forma é a degradação de matéria orgânica (fezes, restos de alimento, animais mortos) para manutenção da dinâmica ecológica entre os organismos de cultivo e criação de ambiente favorável para crescimento de peixes e camarões (ZHOU et al., 2009).

Os microorganismos utilizados em biorremediação na aquicultura podem ser isolados da natureza. Tais micro-organismos podem ser bactérias de gênero *Bacillus sp.*, *Aeromonas sp.*, *Pseudoaeromonas sp.*, e *Archromobacter sp.* por exemplo, as quais tem características como liberação de enzimas digestivas que aceleram a degradação de componentes orgânicos em determinadas condições (ZHOU et al., 2009). Na tabela I.1 pretende-se resumir alguns dos trabalhos que estudaram determinadas espécies com fins de biorremediação.

Tabela I.1: Micro-organismos de importância para biorremediação

Microorganismo (bactéria ou fungo)	Foco de pesquisa	Referência
<i>Enterococcus</i>	Isolada de <i>Oreochromis niloticus</i> usada para controle de <i>Aeromonas</i> & <i>Sphingomous</i>	TENDENCIA et al., 2004
<i>Alcaligenes sp.</i>	Nitrificação	CASTIGNETTI; GUNNER 1981
<i>Fusarium sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Síntese de NO ₂ -O	CASTIGNETTI; GUNNER, 1981
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Isolada de efluentes de cultivo de bagre africano e posterior utilização para tratamento de efluentes	DIEP et al., 2009
<i>Bacillus spp.</i>	Inibição de infecções gastrointestinais do hospedeiro e sintetiza substâncias antimicrobianas	LIU et al., 2006; HONG; DUC; CUTTING, 2005
<i>Actinomycetes</i>	Alta capacidade de degradar matéria orgânica	ZHOU et al., 2009
<i>Aspergillus spp.</i>	Degradação de matéria orgânica	ZHOU et al., 2009
<i>Aspergillus spp.</i> & <i>Trichoderma sp.</i>	Secretam concentrações elevadas de enzimas como amilases, proteases e celulases para o meu ambiente.	WEIBE, 2003
<i>Aeromonas sp.</i> , <i>Mycelia sp.</i> <i>Candida utilis</i> & <i>Trichoderma viridae</i>	Utilizada para redução de COD e descoloração em efluentes de melaço de cana-sacarina e descoloração	SATYAWALI; BALAKRISHN AN, 2008

c. Produtos comerciais para uso em aquicultura

Os produtos de tratamento biológico comercializados no mercado para uso em aquicultura são agrupados em três diferentes níveis, com base na forma de aplicação e no efeito sobre o cultivo:

- Biocontrole – Utilizados para melhorar a saúde do animal principalmente em cultivo intensivo. A composição de microorganismos de produtos com esse potencial tem ação antagonista as de bactérias patogênicas (MAEDA et al., 1997; MORIARTY, 1998).
- Probiótico – quando o produto administrado tem microorganismos que pode sobreviver no trato digestivo; e melhora a digestibilidade da dieta (GATESOUPE, 1999). Usado principalmente nos primeiros estágios larvais para aumentar a sobrevivência (MERRIFIELD et al., 2010)
- Biorremediador ou produto de bioaugmentação – Relacionados com os utilizados para tratamento de efluentes municipais e industriais e a formulação incorpora bactérias como *Nitrossomonas*, *Sulfobacter* e *Bacillus* e enzimas (proteases, lipases e celulosas) que aceleram a decomposição de material orgânico e reduz a quantidade de lodo no sistema de cultivo (PRIMAVERA et al., 1993; MORIARTY, 1997; 1998; GATESOUPE, 1999).

Os resultados da biorremediação dependem da natureza do produto utilizado e informações técnicas disponíveis (MORIARTY, 1998). A utilização de produtos biorremediadores em aquicultura tem sido reportada na melhoria da qualidade de água e redução de crescimento de bactérias patogênicas no cultivo de peixes e camarões (GATESOUPE, 1999; JIAO et al., 2010).

Neste trabalho, foi estudada a viabilidade da utilização de produtos de biorremediação com especificidade para tratamento de efluentes domésticos, no controle de sólidos gerados no sistema superintensivo de cultivo de *Litopenaeus vannamei*, com biofoco microbiano. Seu caráter inovador se dá pela busca de alternativas de melhoria do sistema de controle de sólidos no cultivo heterotrófico, de camarões marinhos, através da utilização de produtos de biorremediação ambiental disponível no mercado brasileiro. Com esta pesquisa

pretende-se contribuir com o desenvolvimento de aquicultura ambientalmente amigável pela melhoria das técnicas de gestão de qualidade de água em tanques de cultivo.

Com intuito de buscar subsídios sobre a possibilidade de controle de nível de sólidos em cultivos de camarão branco do pacífico com biofloco microbiano, este trabalho foi realizado sob a hipótese de que os produtos comerciais com especificidade para tratamento de efluentes domésticos podem ser utilizados como alternativa para melhoria de qualidade de água durante o cultivo superintensivo com biofloco microbiano de camarões marinhos.

ARTIGO CIENTIFICO**BIOAUMENTAÇÃO POR COMAMBIO® EM SISTEMAS
SUPERINTENSIVOS DE CULTIVO DE CAMARÕES
MARINHOS COM TROCA ZERO DE ÁGUA**

Helena Ragibo Salência¹
José Luiz Pedreira Mouriño¹
Rafael da Fonseca Arantes¹
Marcela Ubert¹
Katt Regina Lapa¹
Walter Quadros Seiffert¹

Artigo formatado com base nas normas da revista **Aquaculture
research**

¹ Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Servidão dos Coroas s/n (fundos), Barra da Lagoa, Florianópolis, SC, Brasil. CEP 88061-600, Tel: (+55) 48 32313401, Fax: (+55) 48 32313434

RESUMO

Comambio[®] foi testado no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema superintensivo com bioflocos microbianos. Primeiramente se determinou a concentração para bioaumentação sobre os sólidos sedimentáveis (SSed) em água contendo bioflocos microbianos. Após se testou duas frequências de aplicação, semanal e quinzenal, sobre os parâmetros zootécnicos dos camarões. Em seguida fez-se a caracterização dos parâmetros físico-químicos de qualidade de água do grupo tratado e sem aplicação. A concentração de $0,56\text{gL}^{-1}$ foi selecionada por reduzir significativamente ($p < 0,05$) de SSed. A frequência de aplicação semanal propiciou maior sobrevivência, crescimento e biomassa final dos animais. Nos grupos tratados não foi observado efeito nocivo aos animais. Sua adição aumentou em 46,76% a taxa de crescimento, 17,0% da biomassa final e 10,23% de sobrevivência em relação ao controle. Houve redução de 63,4 % no SSed com adição do Comambio[®] e os sólidos suspensos totais aumentaram com os sólidos suspensos fixos. A demanda bioquímica de oxigênio no final do cultivo apresentou menor valor no grupo tratado, 70,2% e 17,4% de variação Comambio[®] e controle respectivamente. O bioaumentador reduziu de SSed, contribuindo para o crescimento, redução da conversão alimentar, sobrevivência e da biomassa final dos camarões cultivados tendo sua viabilidade de utilização em cultivo de camarões marinhos confirmada.

Palavras chave: biorremediação, bioflocos, efluente, matéria orgânica, *Litopenaeus vannamei*.

ABSTRACT

Comambio[®] was tested in the *Litopenaeus vannamei* using super intensive farming system with microbial bioflocs. Firstly there was determined the concentration of settleable solids for the bio-augmentation (SSed) in water with microbial bioflocs. The second stage consisted in testing of the application frequency in weekly and biweekly basis upon zootechnical parameters of prawn. Afterwards there were described physical and chemical parameters of water quality in the treated trial without application of Comambio. 0,56gL⁻¹ was the concentration selected to a significant reduction of SSed ($p < 0,05$). The weekly application promoted the chance of living and the final biomass growth of the animals. Furthermore, no side effect was observed among the treated organisms. More specifically, this led to an increase in 46,76% of growth rate, 17,0% in the final biomass and 10,23% of livelihood with regard to the control sample. In addition, there was a dramatic drop in the SSed (63,4 %) with Comambio[®] while the total suspended solids increased with the suspended fixed solids. On the other hand, the biochemical oxygen demand showed the less value amongst the treated and control experiment, 70,2% and 17,4% respectively. As a result, the bioaugmentation decreased SSed contributing to the growth, significant reduction of food conversion and the final livelihood biomass of the shrimp cultivation system. Therefore, the findings confirmed feasibility of their use in marine shrimp farming.

Keywords: Bioremediation, bioflocs, wastewater, organic matter, *Litopenaeus vannamei*.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da aquicultura no mundo é impulsionado como resposta ao consumo e a necessidade da melhoria da segurança alimentar. Espera-se que a indústria aquícola cresça com o aumento da população mundial (FAO, 2008). A redução de níveis de captura da pesca extrativista exige da aquicultura maior esforço e criatividade para responder à necessidade de produção de alimento contornando assim, problemas de escassez de água de qualidade, custo elevados da terra, limitações em descarga da água, impacto ambiental e doenças; propiciando o desenvolvimento da aquicultura orientada para cultivos intensivos (NACA/FAO, 2001; Guetierrez–Wing, 2006).

O cultivo superintensivo de camarões marinhos é resposta à necessidade de aumento de produção em ambientes onde a disponibilidade de água e de espaço é limitada onde existe a necessidade de manutenção da biosseguridade em ambientes passíveis de contaminação por enfermidades, principalmente as de notificação obrigatória (Avnimelech, Mozes & Weber, 1992; Harvegreves, 2006; Avnimelech, 2006; 2007; OIE, 2011).

Nestes sistemas a degradação microbiana de resíduos orgânicos é responsável pela manutenção dos parâmetros da qualidade de água adequados ao cultivo dos camarões peneideos (Browdy, Bratvold, Stokes & McIntosh, 2001; Burford, Thompson, McIntosh, Bauman & Pearson, 2003). Entretanto em altas densidades de estocagem de animais a coluna da água tem capacidade limitada de auto-depuração (Zhou, Li, Jun & Bo, 2009). A bioaumentação é uma estratégia de biorremediação que consiste na introdução de micro-organismos e/ou seus metabólitos em ambientes poluídos visando acelerar a remoção e a biodegradação de contaminantes indesejáveis (Jiao, Zhao, Jin, Hao & You 2010).

O aporte externo de micro-organismos benéficos ao sistema de cultivo aquícola é importante para aumentar a capacidade de auto-depuração, bem como melhorar a qualidade de água, condição favorável para crescimento dos animais dentro do cultivo (Zhou *et al.* 2009). A utilização de bioaumentadores comerciais contendo bactérias do gênero *Bacillus sp.*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitribacter sp.* e *Lactobacillus* em cultivos intensivos de camarões marinhos *Penaeus monodon* (Fabricius 1798) e *Litopenaeus vannamei* (Boone 1931) incrementaram a sobrevivência e reduziram consideravelmente as concentrações de

vibriões, carbono orgânico total e nitrogênio total em águas de cultivo (Moriarty 1998; Wang & He 2009).

Este estudo avaliou a viabilidade de utilização de Comambio[®], produto comercial para biorremediação de tratamento de efluentes domésticos em cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei*, com biofoco microbianos com troca zero de água.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados três ensaios subsequentes para avaliação da viabilidade de aplicação de Comambio[®] nos cultivos superintensivos de camarão branco do pacífico com troca zero de água. A primeira etapa averiguou a dosagem de Comambio[®] a ser aplicada em sistemas superintensivo com biofocos microbianos sobre a redução de SSed dos biofocos microbianos utilizados em cultivos de camarões marinhos. Após a definição da concentração a ser utilizada, foi avaliada a frequência de uso do bioaumentador comercial sobre o desempenho zootécnico de camarões marinhos cultivados em sistema superintensivo com biofocos microbianos. O último ensaio teve por objetivo caracterizar os efeitos do Comambio[®] sobre as variáveis físico químicas de qualidade de água em cultivos superintensivos com biofocos microbianos.

2.1. Material biológico

2.1.1. Bioaumentador

O produto biorremediador utilizado foi o Comambio[®] que possui em sua formulação os seguintes micro-organismos; os *Bacillus cereus*, *B. amyloquificiens* e *B. subtilis*, nas concentrações de 6.17×10^5 CFUmL⁻¹; já na concentração de 9.00×10^3 CFUmL⁻¹ os micro-organismos são *Geotrichum sp.*, *Aspergillus níger*, *Penicillium sp.*, *Mycelia sterilia* e *Trichoderma koningii*; e para *B. brevis* e *Corynecacterium sp.* a concentração é 1.00×10^5 CFUmL⁻¹. As concentrações dos micro-organismos foram fornecidas pela empresa Comam Comércio e Serviços Biorremediação Ltda (2010).

Para auxiliar o entendimento das reações do produto Comambio[®] no sistema de cultivo superintensivo com biofocos microbianos, análises

físico e químicas de 0,56g foram efetuadas em 1L de água do mar autoclavada a 120°C de temperatura e 3,2 gL⁻¹ de salinidade, sem adição de bioflocos, quanto à: pH, alcalinidade, sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos fixos (SSF), sólidos suspensos voláteis (SSV), carbono orgânico total (COT) e demanda bioquímica de oxigênio (DBO). O bioaumentador Comambio[®] foi conservado em câmara fria 22°C até sua utilização em todo o período experimental.

2.1.2. Animais utilizados

Foram utilizados 540 camarões de 1,66±0,10 g para avaliação do efeito do produto Comambio[®] sobre desempenho zootécnico dos camarões; no ensaio para caracterização dos efeitos do Comambio[®] nas variáveis físico químicas de água foram utilizados 1200 camarões com peso médio de 20,62±0,39 g. Todos os animais utilizados foram provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina, resultantes da prole F1, de reprodutores SPF, livres de patógenos específicos, (Genearch[®], Brasil). Até a utilização dos camarões estes foram mantidos em água do mar sem bioflocos microbianos a temperatura de 28°C, salinidade 3,2 gL⁻¹.

2.2. Delineamento Experimental

2.2.1. Determinação de dose

Oito concentrações de Comambio[®] (0,0; 0,11; 0,22; 0,33; 0,44; 0,56; 0,67; 0,78; 0,89 gL⁻¹) foram testadas em água contendo bioflocos microbianos com o nível inicial de SSed em torno de 8,0 mL⁻¹ retirada de cultivo superintensivo com bioflocos microbianos de camarões preparados anteriormente.

O desenho experimental foi ao acaso utilizando-se nove tratamentos e quatro réplicas. Foram utilizadas garrafas plásticas cilindro cônicas de 1,5 L. Água sem aplicação do produto foi utilizada para grupo controle. A aeração e temperatura foram mantidas constantes, em 27°C com aquecedor de titânio Scame[®] de 500 W e aeração para manter o material particulado em suspensão. Para determinar o efeito da concentração, foram mensurados SSed uma vez ao dia utilizando cones de Innoff (APHA, 2005).

2.2.2. **Frequência de Aplicação e Desempenho zootécnico**

Neste ensaio foi avaliado o efeito da utilização e da periodicidade de aplicação do biorremediador Comambio® sobre os índices zootécnicos de juvenis de camarões cultivados em sistema superintensivo com bioflocos microbianos. A periodicidade de aplicação foi dividida quanto às aplicações semanais e quinzenais buscando definir a existência de toxicidade dos animais cultivados quanto à utilização contínua do produto.

O delineamento experimental foi ao acaso com três diferentes tratamentos e quatro repetições cada: Aplicação semanal do produto (semanal), quinzenal (quinzenal) e sem aplicação do bioaumentador (controle). A concentração do bioaumentador aplicado foi a pré-definida no item 2.2.1.

Foram utilizadas unidades experimentais cilindro cônicas de fibra de vidro com capacidade de 25 L, povoadas com 45 juvenis de *Litopenaeus vannamei* apresentando peso médio inicial $1,66 \pm 0,01$ g. Durante o período experimental de 21 dias os camarões foram alimentados com ração comercial contendo níveis de garantia fornecidos pelo fabricante de umidade (máx.) 10%, proteína bruta (mín.) 40%, extrato etéreo (mín.) 7,5%, matéria fibrosa (máx.) 5%, matéria mineral (máx.) 13%, cálcio (máx.) 3%, fósforo (mín.) 1,45%, vitamina A (U.I.) 4.000, vitamina D3 (U.I.) 2.000, vitamina E (U.I.), 150 vitamina C (mg) 140 (Potimar 40 J, Guabi®) a uma taxa de 5% da biomassa total em cada tanque dividida em três parcelas iguais diariamente seguindo recomendações de Van Wyk *et al.* (1999). A temperatura e oxigênio dissolvido na água foram mantidos e monitorados em níveis adequados através de aquecedores de titânio Sacame® de 500 W e controlados por termostato e com uso de aeração constante e suficiente para manter todo material particulado em suspensão.

2.2.3. **Caracterização das variáveis físico químicas em sistema de cultivo sistema superintensivo com bioflocos microbianos tratados com Comambio®**

Foram caracterizadas as variáveis físico-químicas a água de cultivo do sistema superintensivo com bioflocos microbianos adicionados do produto Comambio® na concentração pré-defendida no item 2.2.1 e de

acordo com a periodicidade definida no item 2.2.2. O delineamento experimental foi ao acaso com dois tratamentos e seis réplicas; com aplicação do Comambio[®] e sem aplicação (controle). Foram utilizadas doze unidades experimentais circulares de fibra de vidro, com 1,1 m² e 900 litros de capacidade cada. A água utilizada para abastecer as unidades experimentais foi captada de um tanque de cultivo superintensivo de camarões com bioflocos microbianos já formado para que todos os tanques ao início do experimento estivessem nas mesmas condições de qualidade de água.

A temperatura da água e oxigênio dissolvido foram mantidos constante com auxílio de aquecedores de titânio Scame[®] de 1000 W controlados por termostatos e com aeração controlada e suficiente na busca de manter o material particulado em suspensão e as concentrações de oxigênio dissolvido em valores adequados para o crescimento dos animais monitorado através de oxímetro digital YSI 55.

Camarões adultos com peso médio de 20,62±0,39 g foram mantidos nestas unidades até atingirem peso final de 24 g. A densidade no povoamento foi de 120 camarões/m³ e o experimento teve a duração de 30 dias. Foi fornecida ração comercial Potimar 35 EXT marca Guabi[®], Brasil; com os seguintes níveis de garantia fornecidos pelo fornecedor: umidade (máx.) 10%, proteína bruta (mín.) 35%, extrato etéreo (mín.) 7,5%, matéria fibrosa (máx.) 5%, matéria mineral (máx.) 13%, cálcio (máx.) 3%, fósforo (mín.) 1,45%, vitamina A (U.I.) 4.000, vitamina D3 (U.I.) 2.000, vitamina E (U.I.) 150 e vitamina C (mg) 130. A taxa de arraçoamento foi de 1,7 % da biomassa em cada unidade experimental, administrada em parcelas iguais três vezes ao dia, seguindo recomendações de Van Wyk *et al.* (1999).

2.3. Métodos Analíticos

2.3.1. Análises físico-químicas de água

SSed foram determinados pelo método gravimétrico utilizando cones volumétricos de Inhoff segundo descrito por APHA (2005) nos itens 2.2.1 e 2.2.3 diariamente.

Nas etapas nomeadas 2.2.2 e 2.2.3 foram mensuradas a alcalinidade e a cal hidratada foi adicionada em todos os tanques sempre que seu valor estivesse inferior a 120 mgL⁻¹ de acordo com as quantidades propostas

por (Ebeling, Timmons & Bisogni 2006). A concentração dos compostos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrato) no item 2.2.3, bem como os ortofosfatos foi monitorada com base nos métodos descritos em APHA (2005). SST segundo APHA (1996) - 2540D, SSV e SSF método APHA (1995) – 2540E semanalmente.

A temperatura foi mensurada utilizando termômetro de campo YSI 55, oxigênio dissolvido (O₂) utilizando oxímetro digital YSI 55 nos itens 2.2.2 e 2.2.3 estes dados foram avaliados diariamente nos períodos matutinos e vespertinos.

No item 2.2.3 pH foi mensurado utilizando peagâmetro digital YSI 30, transparência utilizando disco de Secchi diariamente.

DBO e COT foram determinados no princípio e no final do experimento pelos métodos do APHA (2005) – 5210B e APHA (2005) - 52310D respectivamente.

2.3.2. **Análise Bacteriológica**

A determinação das concentrações de bactérias heterotróficas totais e vibriónicas da água foi realizada no início e no final do experimento nos itens 2.2.2 e 2.2.3 do projeto. As amostras de água foram plaqueadas em placas de petri com Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose e Agar Marine e incubadas a 35° C por 24 horas antes da contagem de acordo com Madigan, Martinko & Parker (2002). Cada amostra de água foi analisada em triplicata.

2.3.3. **Índices zootécnicos**

O desempenho zootécnico dos camarões foi determinado pelo ganho de peso semanal, conversão alimentar no item 2.2.2, biomassa final e pela sobrevivência itens 2.2.2 e 2.2.3 conforme as equações 1, 2, 3 e 4. Foram realizadas biometrias uma vez por semana, utilizando 10% da biomassa total em cada tanque, sendo considerado o caminho mínimo amostral para a população finita de 100 animais com níveis de confiança de 90%.

Equação 1:

$$\text{Ganho de peso semanal (GPS)} = \frac{\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}}{\text{Tempo de cultivo (dias)}}$$

Equação 2:

$$\text{Conversão alimentar} = \frac{\text{Ração consumida (g)}}{\text{Ganho de peso (g)}}$$

Equação 3:

$$\text{Biomassa final (g)} = \text{Peso médio final (g)} \times \text{número de animais}$$

Equação 4

$$\text{Sobrevivência (\%)} = \frac{\text{Biomassa final (g)}}{\text{Biomassa inicial (g)}} \times 100$$

2.3.4. Análise estatística

Todos os dados foram analisados através do programa STATISTIC® versão 7.0. A Concentração do Comambio® determinada de acordo com o item 2.1.1, foi definida através de regressão simples a 1% de significância e posteriormente foi realizada análise de variância por ANOVA seguido da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de significância entre os valores obtidos.

Os dados resultantes da metodologia descrita no item 2.2.2 foram avaliados quanto à normalidade, e uma vez detectada, o teste de Bartlett foi aplicado para averiguação da homocedasticidade das variâncias. Nos casos em que não apresentassem homogeneidade, estes dados foram transformados para $\log(x+1)$ e submetidos à análise de variância ($\alpha=5\%$). Em caso de diferença estatística, foi efetuado teste de comparação de médias Tukey (ZAR, 2001).

Para os dados obtidos no item 2.2.3, foi utilizado o teste t-student para averiguação das diferenças significativas ($\alpha=5\%$) (ZAR, 2001). Também

foi calculado para os itens 2.2.2 e 2.2.3 o intervalo de confiança das médias resultantes das contagens de bactérias heterotróficas totais e dos vibriões presentes nas amostras com níveis de significância de 5 %.

3. RESULTADOS

3.1. Características do produto Comambio®

Os dados da análise do produto Comambio® em água do mar “cristalina”, a 3,2 gL⁻¹ de salinidade apresentaram pH 8,2; alcalinidade 126 mgL⁻¹ de CaCO₃; SST 574,5 mgL⁻¹; SSF 495,0 mgL⁻¹; SSV 79,5 mgL⁻¹; DBO 2,0; DQO 2,0 mgL⁻¹; COT 1,8 mgL⁻¹.

Como material de viabilização dos micro-organismos existentes no produto, Comambio® possui 90% de carbonatos os quais correspondem a 56% de Mg₂CO₃ e 36% de CaCO₃ segundo dados fornecidos pelo fabricante.

3.2. Determinação de dose

Foi observada relação linear significativa ($p < 0,01$) entre a concentração de Comambio® e SSed na água do cultivo superintensivo de camarões, Fig. 1, descrita pela equação $y = -3,3439x + 8,9882$; $R^2 = 0,889$. O aumento da concentração de Comambio® incrementou a redução do volume de SSed. Verificou-se ainda que as concentrações de 0,56 a 0,89 mL⁻¹ (SSed = 6,5; 6,62; 6,37 e 5,87 mL⁻¹) de Comambio® obtiveram maior efeito na redução de SSed comparado ao grupo controle, 8,93 mgL⁻¹. A linha “Z” na Fig. 1 é a linha de referência que corresponde ao extremo inferior do intervalo de confiança da média do controle a 5% de confiança. Valores de SSed abaixo da linha de referência são estatisticamente inferiores que os valores acima da linha ($p < 0,05$). A concentração de 0,56 mL⁻¹ de Comambio® foi identificada como valor de referência pela redução de SSed em 13% e por ser a mínima com redução significativa de SSed.

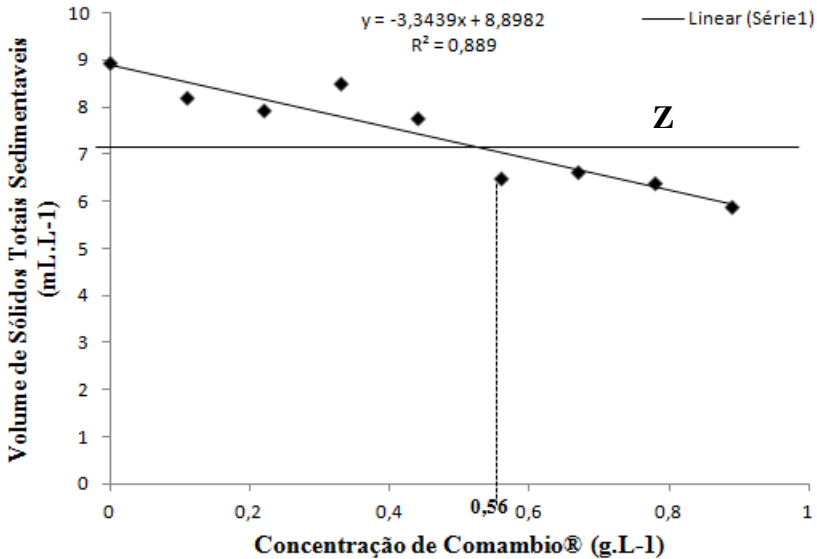


Figura 1: Variação de sólidos sedimentáveis (SSed) na água retirada de cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com biofoco em função da concentração de Comambio® 96 horas após a aplicação. Linha (-) é a reta da regressão linear segundo a equação $Y = -3.3439x + 8.8982$; $R^2 = 0.889$, $p < 0.01$. E “Z” é linha de referência que corresponde ao extremo inferior do intervalo de confiança da média do controle a 5% de confiança. Valores de SSed abaixo da linha de referência são estatisticamente inferiores que o grupo controle ($p < 0,05$).

3.3. Frequência de aplicação e desempenho zootécnico

O ganho de peso e a biomassa final foram superiores nos tratamentos com Comambio®, $1,52 \pm 0,14$ g; $361,01 \pm 15,95$ g e $1,57 \pm 0,29$ g e $351,34 \pm 30,06$ g para tratamentos semanal e quinzenal respectivamente em relação ao controle que teve $1,07 \pm 0,02$ g e $308,41 \pm 38,37$ g para ganho de peso semanal e biomassa final respectivamente, tal como pode se verificar na Tab.1. A aplicação semanal do biorremediador incrementou a biomassa final em 17% no cultivo de juvenis de camarão. Observou-se também que a inoculação do biorremediador aumentou o ganho de peso semanal dos camarões em 46,73%. A conversão alimentar reduziu significativamente nos grupo tratados com o biorremediador, $1,27 \pm 0,11$ e $1,36 \pm 0,26$ nos tratamentos semanal e

quinzenal respectivamente, sendo 56,7 % de redução no tratamento semanal em relação ao controle. A conversão alimentar no grupo controle foi de $1,99 \pm 0,66$ já a sobrevivência que foi de $72,5 \pm 5,54\%$ no controle, $71,65 \pm 4,56\%$ no semanal e $71,86 \pm 6,57\%$ no tratamento quinzenal não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

A aplicação do produto na água do cultivo (item 2.2.2) incrementou significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência e a biomassa final dos camarões cultivados sendo $82,24 \pm 3,98\%$; $20288,93 \pm 170,40\text{g}$ e $92,72 \pm 2,96\%$; $22588,58 \pm 54,36\text{ g}$ para controle e Comambio[®] respectivamente e o aumento foi de $10,23\%$ no tratamento Comambio[®], para a taxa de sobrevivência e contribuiu para um incremento de $11,34\%$ na biomassa final.

Tabela 1: Efeito da frequência de aplicação semanal e quinzenal de Comambio[®] sobre os índices zootécnicos (média \pm desvio padrão) de *Litopenaeus vannamei* em sistema de cultivo superintensivo com bioflocos microbianos.

Índices zootécnicos	Tratamentos		
	CONTROLE	SEMANAL	QUINZENAL
Ganho de peso semanal (g)	1,07 \pm 0,02 ^a	1,52 \pm 0,14 ^b	1,57 \pm 0,29 ^b
Conversão alimentar	1,99 \pm 0,62 ^b	1,27 \pm 0,11 ^a	1,36 \pm 0,26 ^a
Biomassa final (g)	308,41 \pm 38,37 ^a	361,01 \pm 15,95 ^b	351,34 \pm 30,06 ^b
Sobrevivência (%)	72,5 \pm 5,54 ^a	71,65 \pm 4,56 ^a	71,86 \pm 6,57 ^a

Legenda: Letras diferentes entre as colunas representam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Tabela 2: Índices zootécnicos (média \pm desvio padrão) no cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei*, com bioflocos microbiano com aplicação de biorremediador (Comambio[®]) e sem biorremediador (Controle).

Parâmetros zootécnicos	Tratamento	
	CONTROLE	COMAMBIO [®]
Peso inicial (g)	20,64 \pm 0,34	20,64 \pm 0,34
Peso final (g)	24,44 \pm 1,03	24,81 \pm 0,63
Ganho de peso semanal g	1,09 \pm 0,22	1,07 \pm 0,23
Biomassa final (g)	20288,93 \pm 170,4*	22588,58 \pm 54,36
Sobrevivência (%)	82,24 \pm 3,98*	92,72 \pm 2,96

Legenda: (*) simboliza diferença estatística ($p < 0,05$).

3.3.1. Análise microbiológica

O intervalo de confiança ($\alpha=0,05$), para as concentrações de bactérias totais heterotróficas do grupo controle em todos os ensaios foi de $3,14 \times 10^5$ UFCmL⁻¹ até $8,11 \times 10^5$ UFCmL⁻¹; para as contagens de bactérias tipo vibriões o intervalo de confiança foi de $5,00 \times 10^5$ UFCmL⁻¹ até $1,67 \times 10^6$ UFCmL⁻¹. Já o grupo tratado com Comambio® teve o intervalo de confiança para as contagens de bactérias totais heterotróficas variando de $1,20 \times 10^6$ UFCmL⁻¹ até $3,99 \times 10^6$ UFCmL⁻¹; e para as contagens de bactérias tipo vibriões as concentrações variaram de $4,25 \times 10^5$ UFCmL⁻¹ até $1,28 \times 10^6$ UFCmL⁻¹. Os valores estão apresentados desta forma, pois não obtiveram diferenças significativas comprovadas ($\alpha=0,05$) entre os tratamentos e em ambos os ensaios.

3.4. Caracterização das variáveis físicas químicas do sistema de bioflocos tratados com Comambio®

Durante o período experimental, a temperatura foi mantida no intervalo entre $27,90 \pm 0,21$ a $28,50 \pm 0,31$ °C e o O₂ apresentou valores mínimos de 5,80 e máximo de 6,30 mgL⁻¹ tanto no grupo controle como no tratamento Comambio® e não houve diferenças significativas para as variáveis O₂, pH, salinidade, transparência e SSed como se pode observar na Tab. 3. Verificou-se diferença ($p < 0,05$) na alcalinidade da água do cultivo entre os tratamentos a partir da segunda semana de cultivo, Tab. 3, sendo superior no tratamento com bioaumentador a qual foi de $160,01 \pm 60,70$ mgL⁻¹ de CaCO₃ e $102,00 \pm 6,50$ mgL⁻¹ para grupo controle no final do cultivo.

A concentração de NH₄-N na água de cultivo não diferiu entre os tratamentos, variando de $0,04 \pm 0,03$ para o valor final de $0,10 \pm 0,05$ mgL⁻¹ no grupo controle e de $0,04 \pm 0,03$ para $0,12 \pm 0,012$ mgL⁻¹ no grupo Comambio®. Verificou-se aumento de NO₂-N na primeira semana nos dois tratamentos e reduziu gradativamente até o final do experimento Tab.3. A concentração do NO₂-N foi superior, ($p < 0,05$), no tratamento com biorremediador depois da aplicação do produto nos tanques de cultivo, $0,18 \pm 0,05$ mgL⁻¹ comparado com $0,12 \pm 0,03$ mgL⁻¹ no grupo controle. Houve aumento na concentração de nitrato (NO₃-N) nos dois tratamentos, que partiram de valores iniciais de $8,87 \pm 1,25$ atingindo concentrações de $23,27 \pm 4,60$ mgL⁻¹ no tratamento Comambio® e $23,80 \pm 2,87$ mgL⁻¹ no controle e não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos. A concentração de ortofosfatos variou de

$3,40\pm 0,20$ mgL⁻¹ para $3,66\pm 0,23$ mgL⁻¹ no tratamento controle e de $3,40\pm 0,20$ para $3,34\pm 0,35$ mgL⁻¹ no tratamento Comambio[®] onde também não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos.

Em relação aos sólidos, houve aumento na concentração de SST ao longo do cultivo em ambos os tratamentos. Valores médios de SST aumentaram de $501,07\pm 32,67$ mgL⁻¹, para $1558\pm 532,24$ mgL⁻¹ no tratamento Comambio. Enquanto que, no grupo controle, o aumento foi de $501,07\pm 32,67$ mgL⁻¹, para $844,50\pm 68,71$ mgL⁻¹. A concentração foi significativamente superior no tratamento com o bioaumentador.

A concentração de SSF foi superior ($p<0,05$) no grupo Comambio[®] quando comparada ao grupo controle (Tab. 3). Valores finais de $1120,80\pm 378,58$ mgL⁻¹ no tratamento com bioaumentador foram significativamente superiores a $428\pm 39,22$ mgL⁻¹ verificado no controle. Por outro lado, os SSV, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos como pode se verificar na Tab.3. No grupo controle, SSV teve variação de $211,67\pm 55,69$ mgL⁻¹ para $416,00\pm 33,51$ mgL⁻¹ e no grupo Comambio[®] variou de $211,67\pm 55,69$ mgL⁻¹ para $432,00\pm 76,18$ mgL⁻¹.

Tabela 3: Características físico-químicas da água (média±desvio padrão) durante o período experimental de cultivo superintensivo de camarões marinhos, *Litopenaeus vannamei* com bioflocos microbiano com aplicação de biorremediador (Comambio®) e sem biorremediador (Controle). Os dados na semana 0, correspondem a análises realizadas nos dois tratamentos no início do experimento.

Variáveis físicas químicas	CONTROLE Semanas					COMAMBIO® Semanas				
	0	1	2	3	4	1	2	3	4	
OD (mgL ⁻¹)	5,9±0,28	5,9±0,08	5,8±0,09	5,8±0,09	5,8±0,08	5,9±0,28	5,8±0,16	5,8±0,14	5,80±0,13	
Temperatura (°C)	27,09±0,32	27,9±0,27	27,9±0,23	27,9±0,22	27,9±0,21	27,9±0,32	28,1±0,30	28,01±0,31	27,90±0,30	
pH	7,8±0,08	7,8±0,05	7,8±0,06	7,8±0,08	7,8±0,09	7,8±0,12	7,8±0,10	7,8±0,10	7,80±0,01	
Salinidade (g.L ⁻¹)	3,20±0,12	3,31±0,12	3,26±0,36	3,25±0,47	3,22±0,50	3,32±0,09	3,25±0,21	3,23±0,27	3,21±0,30	
NH ₄ -N (mgL ⁻¹)	0,04±0,03	0,12±0,04	0,14±0,04	0,10±0,05	0,10±0,05	0,13±0,07	0,14±0,05	0,11±0,05	0,12±0,05	
NO ₂ -N (mgL ⁻¹)	0,09±0,02	0,12±0,03	0,11±0,06*	0,07±0,01	0,04±0,01	0,18±0,05	0,16±0,08	0,10±0,05	0,06±0,02	
NO ₃ -N (mgL ⁻¹)	8,87±1,24	12,3±0,68	16,50±2,90	17,2±6,10	23,8±2,80	14,3±2,10	11,3±1,69	22,7±3,55	23,40±4,60	
PO ₄ -P (mgL ⁻¹)	3,40±0,20	3,71±0,20	3,27±0,26	3,38±3,12	3,66±0,23	3,70±0,16	3,26±0,26	3,26±0,15	3,34±0,35	
CaCO ₃ (mgL ⁻¹)	120±0,10	98±3,80	106±7,90	115±3,50	102±6,50	100±3,30	147±28,5	168±48,70	160±60,70	
Transparência (cm)	15,10±0,05	14,40±1,20	13,7±0,90	13,10±1,40	12,5±1,00	11,2±0,90	10,8±1,20	10,1±1,40	9,70±1,30	
Turbidez (NTU)	104,30±24,80	104,30±24,80	125,7±36,10	140,19±44,10	161,9±45,10*	174,8±49,50*	179,9±37,6	217,2±55,40	277,03±64,30	
SST (mgL ⁻¹)	501,07±32,67	569,80±91,60*	689,8±44,40*	642,0±63,00*	844,5±68,70*	854,3±126,20	994,8±142,70	1223,5±380,20	1558,80±553,20	
SSF (mgL ⁻¹)	289,01±28,53	321,30±65,90*	386,6±30,50*	402,1±245,40*	428,5±39,20*	566,0±79,91	670,6±142,10	809,3±344,20	1120,80±376,50	
SSV (mgL ⁻¹)	204,33±35,75	248,5±34,70	303,2±17,40	344,0±44,50	416,0±33,50	288,3±69,30	324,0±42,80	323,6±111,40	432,20±76,20	
SSed (mLL ⁻¹)	8,41±0,07	9,3±1,10	11,4±1,10	13,9±2,40	16,6±3,10	8,4±1,10*	6,9±1,30*	10,9±3,10*	13,80±2,60	

Legenda: (*) simboliza diferença estatística entre os tratamentos na mesma semana de cultivo ($p < 0,05$).

Na Fig.2 está ilustrada a influência do Comambio® no volume de SSed presente na água de cultivo. O volume de SSed foi significativamente ($p < 0,05$) inferior no grupo Comambio®, no período entre o terceiro e décimo sétimo dias de cultivo. A maior redução de sólidos foi verificada após a segunda aplicação do produto, na segunda semana de cultivo, com redução de 63,4% no volume de SSed de $9,92 \pm 0,49$ a $3,58 \pm 0,92$ mLL^{-1} no tratamento Comambio®. Depois da terceira semana de cultivo a redução dos SSed foi diminuindo até ao final do cultivo onde os volumes de sólidos foram de $13,80 \pm 2,60$ mLL^{-1} no tratamento com produto e $16,60 \pm 3,20$ mLL^{-1} . Na última semana de cultivo não foi observada diferença significativa no volume de SSed.

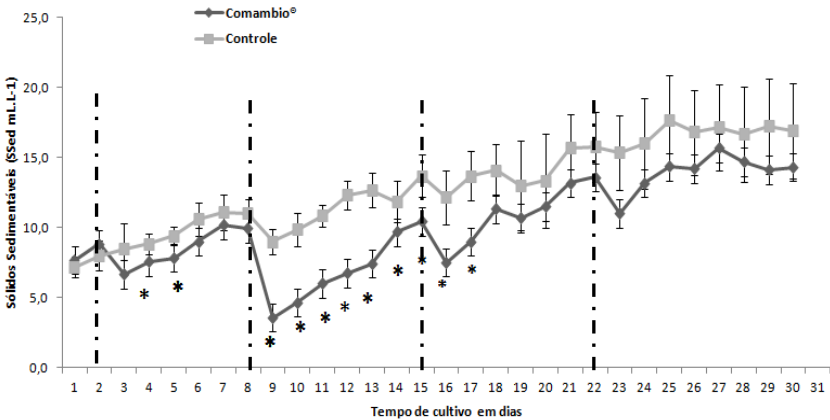


Figura 2: Efeito de Comambio® no volume de sólidos sedimentáveis (SSed) (média± desvio padrão) durante o cultivo de matrizes de *Litopenaeus vannamei* em sistema superintensivo com troca zero de água. (*) simboliza média estatisticamente diferente. Linha (— · —) é referente a aplicação do biorremediador ($p < 0,05$).

A DBO no início de cultivo foi de $13,31 \pm 1,55$ mgL^{-1} nos dois tratamentos e reduziu em 70,2% no tratamento Comambio® e 17,4% no tratamento controle. A concentração de DBO no final de cultivo foi significativamente ($p < 0,05$) inferior, $3,1 \pm 1,55$ mgL^{-1} , no tratamento com bioaumentador em relação ao grupo controle que foi de $10,95 \pm 0,63$ mgL^{-1} como pode se observar na Fig. 3.

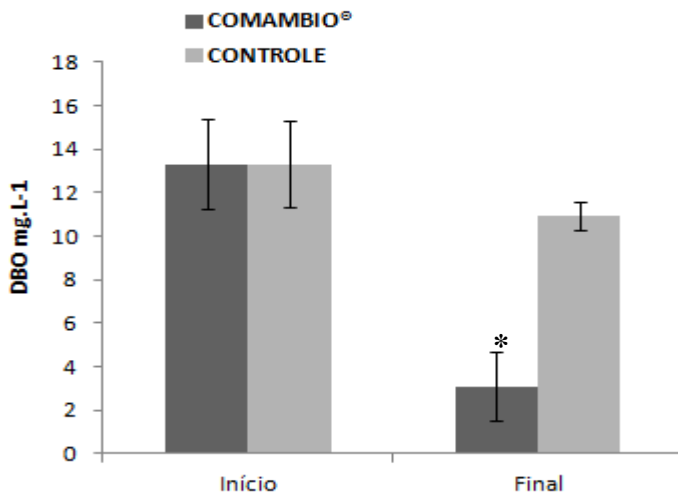


Figura 3: Dados da Demanda Bioquímica de Oxigênio (média±desvio padrão) no cultivo superintensivo de *Litopenaeus vannamei* com bioflocos microbianos com biorremediação e sem biorremediação no início e no final o cultivo. (*) simboliza diferença estatística ($p < 0,05$).

A média do COT durante o período experimental variou de valor inicial $19 \pm 0,44 \text{ mgL}^{-1}$ para $29 \pm 0,12 \text{ mgL}^{-1}$ valor final no controle e de $19 \pm 0,10$ para $29 \pm 0,20 \text{ mgL}^{-1}$ no tratamento com Comambio® e não foi observado diferença significativa entre os tratamentos.

4. DISCUSSÃO

Os dados da caracterização inicial do produto Comambio® em água do mar “cristalina” sugerem aumento da quantidade de sólidos suspensos totais e fixos, o que pode ser prejudicial em utilização contínua do mesmo. O aumento da alcalinidade da água devido a utilização do produto ($8,2 \text{ mgL}^{-1}$ de CaCO_3) pode ser discutida com referência ao material de viabilização dos micro-organismos existentes no produto os quais correspondem a CaCO_3 e Mg_2CO_3 fornecidos e discutidos pelo fabricante.

O aumento da concentração do bioaumentador em água contendo bioflocos microbianos resultou em maior proporção de micro-organismos existentes no produto ocasionando provavelmente maior

atividade microbiana no sistema resultando na maior redução de S.Sed. Segundo Jiao *et al.* (2011) a alta concentração de micro-organismos através do agente bioaumentador é essencial no processo de bioaumentação para manter concentração necessária de micro-organismos benéficos no sistema que se pretende remediar, pois muitas bactérias possuem um mecanismo de coordenação de expressão gênica, chamado “quorum-sensing”, que regula as respostas e os mecanismos de produção de fenótipos como produção de enzimas, toxinas, formação de biofilmes entre outros (Fuqua & Greenberg, 2002; Defoirdt, Boon, Bossier & Verstraete, 2004 Fuqua & Greenberg, 2002).

A influência dos bioaumentadores no crescimento e sobrevivência de camarões cultivados já foi relatada por outros autores (Moriarty 1998; Janeo *et al.* 2009). O uso de bioaumentador Comambio[®], não demonstrou nenhum efeito nocivo aos animais cultivados já que os mesmos apresentaram crescimento positivo e nenhuma alteração fisiológica depois da aplicação contínua. Sua incorporação no cultivo apresentou melhoria nos índices zootécnicos dos animais cultivados em condição superintensiva. Apesar de não ter sido testado em cultivo superintensivo, Janeo *et al.* (2009) observaram resultado semelhante em cultivo intensivo de *Peaeus monodon* depois de aplicação de bioaumentador contendo *Nitrobacter* e *Bacillus* (aproximadamente 3.10^9 CFUg⁻¹) e lípases e proteases aplicado em doses de 100 g/ha, 150 g/ha, 200 g/ha e 300 g/ha. O efeito dos biorremediadores na sobrevivência dos camarões cultivados verificado no presente estudo pode estar relacionado à sua contribuição na composição da microbiota do trato gastrointestinal e do meio de cultivo dos camarões.

Apesar de não utilizar bactérias autóctones ao cultivo de camarões, o bioaumentador Comambio[®] apresenta em sua composição *Bacillus spp.* Bactérias do gênero *Bacillus* têm capacidade de reduzir a quantidade de patógenos presentes na água de cultivo, assim como diminuir as concentrações de nutrientes na água, atuando assim como bioaumentador e como biocontrole (Lallo, Ramchuran, Ramduth, Gorgens & Gardine, 2007).

Outros micro-organismos também encontrados no produto utilizado como fungos *Aspergillus níger* e *Trichoderma sp.* são conhecidos por sua capacidade de secretar enzimas digestivas como amilases, proteases e celulases para o ambiente (Weibe 2003) que pode ter contribuído para o aumento de crescimento e sobrevivência dos camarões no cultivo.

Janeo *et al.* (2009) reportou resultados de aumento de crescimento em *Peaeus monodon* com a aplicação de um bioaumentador em água de cultivo que possuía bactérias do gênero *Nitrobacter* e *Bacillus* assim com lipases e proteases atribuindo esse crescimento a atividade enzimática na conversão de resíduos orgânicos em nutrientes acessíveis para os micro-organismos.

Segundo Bomba, Nemcová, Mudroňa & Guba (2002) cepas microbianas selecionadas podem melhorar o aproveitamento do alimento e consequentemente a sobrevivência e crescimento do animal (camarões ou peixes) em cultivo. Os micro-organismos existentes no produto Comambio[®] também podem competir pelo espaço com bactérias patogênicas nos tanques de cultivo mantendo condições favoráveis às concentrações dos micro-organismos benéficos no sistema o que pode inibir surtos de bactérias do gênero *Vibrio sp.* mecanismo descrito como sendo um dos principais para atuação de bactérias probióticas (Gateuspe 1999; Zhou *et al.* 2009; Merrifield, Dimitroglou, Foey, Davies, Baker, Bøgald, Castex & Ringø 2010).

A biorremediação foi reportada como solução para controle de bactérias patogênicas em cultivos aquícolas (Moriarty 1999; Janeo *et al.* 2009). No presente estudo, não foi constatado o efeito do bioaumentador nas concentrações de bactérias do gênero *Vibrio* uma vez que não foi realizada seleção para averiguar a capacidade inibitória de patógenos na fabricação do produto e escolha de cepas. Por outro lado, o método de contagem de bactérias baseada em microbiologia aplicada, subestima a medição quantitativa e qualitativa das populações de bactérias heterotróficas, podendo interferir na interpretação de resultados de biorremediação pela restrição de interpretação de fatores bióticos e abióticos (Head 1998). Poderiam ser interpretados estes resultados através de métodos de ecologia microbiana como extração total de DNA e microscopia de epifluorescência entre outros.

A temperatura, O₂ e pH estavam nos níveis recomendados para o crescimento de camarões nos dois experimentos. Esses resultados corroboram com os trabalhos de McIntosh *et al* (2000) que também não observaram alteração nos níveis de O₂, temperatura e salinidade com aplicação de produtores comerciais de bioaumentação contendo *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, e *B. polymyxa*), ou contendo apenas *B. licheniformis* em cultivo de *Litopenaeus vannamei* sem renovação da água.

A entrada de produto biorremediador no tratamento Comambio[®] pode ter contribuído para o aumento da alcalinidade uma vez que a necessidade de utilização de cal durante o cultivo foi menor em relação ao controle provavelmente devido ao material de viabilização dos micro-organismos do produto que possui CaCO_3 e de Mg_2CO_3 materiais que poderão interferido na alcalinidade na água do cultivo.

A redução de alcalinidade verificada no grupo controle pode estar relacionada à ocorrência de nitrificação uma vez que foi observada aumento de nitrato no cultivo (Hargreaves 2008).

A redução de SSed durante o cultivo imediatamente após a adição do Comambio[®] sugere existência de especificidade dos micro-organismos presentes no produto em relação ao substrato no sistema de cultivo uma vez que as características de sedimentabilidade do lodo em sistemas de bioflocos microbianos são diretamente afetadas pela composição microbiana existente na água (Crab, Avnimelech, Defoirdt, Bossier & Verstraete, 2007).

A composição microbiológica de Comambio[®] contribuiu para a redução de sólidos sedimentáveis verificada no cultivo. Resultados semelhantes foram reportados por Primavera, Lavilla-Pitogo, Ladjá & Dela Peña (1993), que observaram redução de lodo formado em viveiros de produtores de cultivo intensivo de *Penaeus monodon* que utilizavam produtos comerciais contendo bactérias de gênero *Nitrosomonas*, *Sulfobacter*, *Bacillus sp* e/ou enzimas (proteases, celulasas) para controle de qualidade de água em concentrações definidas segundo as especificações de cada produto utilizado pelo produtor.

A rápida elevação na concentração de sólidos suspensos totais observada no grupo tratado está associada à adição contínua de sólidos no sistema de cultivo através do produto, visto que a avaliação de SST demonstrou que boa parte deste se apresenta na fração mineral, na forma de SSF. Análises realizadas com o bioaumentador mostraram que acima de 80% do produto são SSF. Os valores de SSF apresentaram aumento durante todo o cultivo indicando que o uso do Comambio[®] nas concentrações aplicadas deverá estar associado à remoção do excesso de sólidos fixos produzidos. Adicionalmente, uma maior aplicabilidade deste produto para utilização em aquicultura, poderá ser alcançada

através da redução nas proporções de sólidos fixos empregadas na confecção do mesmo.

Mesmo que até ao final do cultivo a concentração de SSF não tenha interferido no desempenho zootécnico dos camarões cultivados, não se teve acesso a literatura com descrições de crescimento de camarões em concentrações de SSF superiores aos observados neste estudo sendo referenciados valores abaixo de 1000 gL^{-1} (Ray, Lewis, Browdy & Leffler 2010).

O teor de SSV e a concentração de COT não diferiram estatisticamente entre os tratamentos sugerindo que não houve redução de quantidade de matéria orgânica com adição do bioaumentador. Porém Wang & He (2009) reportaram redução de COT no sedimento de viveiros de cultivo intensivo de *Litopenaeus vannamei* depois de aplicação de um bioaumentador comercial contendo de $10^{10} \text{ UFCg}^{-1}$ de *Bacillus sp.*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitribacter sp.* e *Lactobacillus*.

Entretanto, os dados da DBO apontam para menor valor no grupo tratado ao final do período experimental. Esta redução da DBO como resultado da aplicação do produto Comambio[®] pode ser indicação da redução na fração da matéria orgânica. Resultados similares já foram relatados por Jiao *et al.* (2010) que reportaram aumento na redução da DBO em sistema de tratamento de efluente doméstico com aplicação de cepas bacterianas e trabalho de Wang & He (2009) observaram também redução da DBO e DQO em cultivos de camarões com aplicação de produtos contendo bactérias do gênero *Bacillus sp.*, *Nitrosomonas sp.*, *Nitribacter sp.* e *Lactobacillus*.

Valores mais elevados na concentração de nitrito, na primeira semana podem indicar a mineralização da matéria orgânica imediatamente após a adição do produto biorremediador, entretanto, a concentração de matéria mineralizada dissolvida, na forma de ortofosfato e nitrato, não apresentou diferenças entre os tratamentos (Hargreaves, 1998). Mcintosh (2000) também não observou diferença na concentração de nitrato depois de aplicação de probióticos em cultivo de camarões. Contudo, Kuhn, Drahos, Marsh & Flick Jr. (2010) reportaram redução de amônia e nitrito como resultado de aplicação de produtos biorremediadores em tanques de cultivo intensivo de camarões marinhos.

A dinâmica da matéria orgânica e os processos de mineralização ainda são pouco compreendidos em sistema de cultivo superintensivo (Hargreaves, 2006; Vinatea, Gálvez, Browdy, Stokes, Venero, Haveman, Lewis, Lawson, Shuler & Leffler 2010). A aplicação do produto pode ter originado aumento da biomassa microbiana no cultivo através da degradação de matéria orgânica contribuindo para alteração da qualidade e diversidade da microbiota (Avnimelech, 1999). Os métodos de determinação de SSV e TOC não discriminam a qualidade de matéria orgânica presente na amostra (APHA, 2005) não indicando necessariamente ausência da degradação/oxidação de matéria orgânica. Sendo que a avaliação da atividade microbiana provavelmente pode contribuir para verificação da hipótese.

Como sugestão para entendimento das relações de micro-organismos presentes dentro do sistema superintensivo com bioflocos microbiano em relação ao produto de bioaugmentação é de extrema importância à utilização de ferramentas moleculares de identificação microbiana, bem como sua relação com os índices zootécnicos e de parâmetros físico-químicos da água de cultivo. Outro mecanismo que podemos adicionar em estudos futuros é o dimensionamento de decantadores para retirada de material em suspensão como os sólidos, que de acordo com nossos resultados podem ser utilizados conjuntamente com estes produtos bioaugmentadores não necessitando de enormes volumes para o tratamento de efluentes já que os mesmos reduziram o volume de sólidos decantáveis sugerindo aumento da velocidade de decantação a qual não foi mensurada neste ensaio.

Conclui-se que a bioaugmentação pode ser aplicado no cultivo de camarões com troca zero de água uma vez que sua utilização apresentou efeito imediato na redução do volume de sólidos sedimentáveis; Os efeitos da utilização contínua do biorremediador sobre as características da comunidade microbiana presente na água de cultivo deverão ser estudados, tendo em conta que sua aplicação semanal contribuiu de forma significativa para o crescimento dos camarões e consequentemente o aumento da biomassa final.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem o Programa Internacional de Bolsas de Estudo da Fundação Ford, Representado em Moçambique pelo Instituto África-América, pela bolsa de mestrado concedida, ao Ministério das Pescas em Moçambique pelo incentivo, ao Laboratório da Camarões Marinhos pelo auxílio das instalações utilizadas bem como manutenção dos camarões utilizados na pesquisa, a empresa Genearch LTDA pela concessão de uso da linhagem de animais SPF (specific pathogen free), a empresa Guabi pelo fornecimento da ração utilizada nos experimentos, e a empresa Comam Comercio Biorremediação LTDA pelo fornecimento do Comambio® e auxílio financeiro de todas as análises executadas e ao revisor do manuscrito, Dr. Luis Hamilton, Engenheiro sanitário pesquisador Epagri. Ao Cnpq por conceder uma parte do apoio com o processo n° 472690/2011-4 (chamada universal 14/2011) e por conceder bolsa de pós doutorado ao pesquisador José Luiz P. Mouriño (processo 303503/2011-4).

6. Referências

- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2005) Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st 53d. APHA: Washington. 676 p.;
- Avnimelech Y., (1999) Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* **176**, 227–235;
- Avnimelech Y., (2006) Bio-filters: The need for an new comprehensive approach. *Aquacultural Engineering* 34, 172–178;
- Avnimelech<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014486099290002F>- AFF1 Y., Moze N. & Weber B. (1992) Effects of aeration and mixing on nitrogen and organic matter transformations in simulated fish ponds. *Aquacultural Engineering* **11**, 157–169;
- Avnimelech Y., (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal water discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* **264**, 140–147;

Bomba A., Nemcová R., Mudroňá D., Guba P. (2002) The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* **13**, 121–126;

Browdy C.L., Bratvold, D., Stokes, A.D., McIntosh, R.P. (2001) Perspectives on the biotechnology, vol **51**. Springer, Berlin, pp. 113–154;

Burford M.A., Thompson, P.J., McIntosh, R.P., Bauman, R.H., (2003) Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *Br. J. Nutr.* **88** (Suppl. 1), 95–99;

Comam comércio e services de biorremediação LTDA, 2010. Relatório de Análises Microbiológicas do produto Comambio. [leaflet] Abril de 2010 ed.: Comam-Comércio e serviços de biorremediação LTDA. Campinas, São Paulo, Brasil.

Crab R., Avnimelech Y., Defoirdt T., Bossier P. Verstraete W. (2007) Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. *Aquaculture* **270**, 1–14;

Defoirdt T., Boon N., Bossier P. & Verstraete W. (2004) Disruption of bacterial quorum sensing: an unexplored strategy to fight infections in aquaculture. *Aquaculture* **240**, 69-88.

Ebeling J.M, Timmons M.B & Bisogni J.J. (2006) Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. *Aquaculture* **257**, 346 – 358;

Ehrlich K.E., Horsfall, F.L., Cantin, M.C., Turcotte, A. (1988) Bioaugmentation technology to improve aquacultural production and to protect and to restore water bodies. In: *Proceedings of Aquaculture International Congress*, Vancouver, Canada, pp. 54–56;

FAO. © 2006-2010. Fisheries Gateway. Aquaculture. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 23 March 2009. [Cited 29 June 2010]. <http://www.fao.org/fishery/topic/2017/en>

Fuqua G. & Greenberg E.P. (2002) Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. *Nature reviews* **3**, 685-696.

Gutierrez-Wing M.T. & Malone R.F. (2006) Biological filters in aquaculture: Trends and research directions for freshwater and marine applications. *Aquacultural Engineering* **34**, 163–171;

Hargreaves J.A. (1998) Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds *Aquaculture* **166**, 181–212;

Hargreaves J.A. (2006) Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. *Aquacultural Engineering*. **34**, 344–363;

Head I. (1998) Bioremediation: towards a credible technology. *Microbiology* **144**, 599-408;

Janeo R., Corre Jr. V.L. & Sakata T. (2009) Water quality and phytoplankton stability in response to application frequency of bioaugmentation agent in shrimp ponds. *Aquacultural Engineering* **40**, 20–125;

Jiao Y., Jin, W.B., Zhao, Q.L., Zhang, G.D., Yan, Y., Wan, J. (2009) Transformation of nitrogen and distribution of nitrogen-related bacteria in a polluted urban stream. *Water Sci. Technol.* **60**, 1597–1605;

Jiao Y., Zhao Q., Jin W., Hao X. & You S. (2011) Bioaugmentation of a biological contact oxidation ditch with indigenous nitrifying bacteria for in situ remediation of nitrogen-rich stream water. *Bioresource Technology* **102**, 990–995;

Kesarcodi-Watson A., Kaspar H., Lategan M.J, Gibson L. (2008) Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* **274**, 1–14;

Laloo, R. Ramchuran, S.; Ramduth, D.; Gorgens, J.; Gardiner, N. (2007) Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1471–1479;

Madigan M.T., Martinko J., Parker J. (2002) *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall, 10th edition. 1104p. Goodreads;

Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J, Baker, R.T.M. Bøggwald J., Castex M. & Ringø E. (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture* **302**, 1–18;

Moriarty D.J .W. 1987. Methodology for determining biomass and productivity of microorganisms in detrital food webs, p. 4-31. *In* D.J.W. Moriarty and R.S.V.Pullin (eds.) *Detritus and microbial ecology in aquaculture*. ICLARM Conference Proceedings **14**, 420 p. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manila, Philippines;

Moriarty D.J.W. (1998) Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* **164**, 351–358;

Moriarty D.J.W. (1999) Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Bell, C.R., Brylinsky, M., Johnson-Green, P. (Eds.), *Microbial Biosystems: New Frontiers: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada;

NACA/FAO (2001) In: Subasinghe, R. P., Bueno, P., Phillips, M. J., Hough, C., McGladdery, S. E. & Arthue, J. E. (eds) *Technical proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millenium*. Bangkok, Thailand, February 20–25, 2000. NACA/FAO, Bangkok/Rome, p. 471;

OIE (2010) 78th General Session: strategies reinforced. *Bulletin*, No.4

Porubcan, R.S. (1991) Reduction of ammonia nitrogen and nitrite in tanks of *Penaeus monodon* using Floating biofilters containing proceed diatimaceous earth media pre-inoculated with nitrifying bacteria. Program and Abstracts of the 22nd Annual Conference and Exposition, World Aquaculture Society **22**, 16–20;

Primavera J.H, Lavilla-Pitogo C. R., Ladja J. M. & Dela Peña M. R. (1993) Survey of Chemical and Biological Products used in Intensive Prawn Farms in the Philippines. *Marine Pollution Bulletin* **26**. 35-40.;

Tucker C. S. & Hargreaves J. A. (2006) Water-level management and BMPs cut water use and pond effluents. *Global Aquaculture Advocate* **9**, 50-51;

Tucker C.S. & Hargreaves J.A. (2004) Pond water quality. In *Biology and Culture of Channel Catfish. Developments in Aquaculture and Fisheries Science* **34**, 215-278;

Vinatea L., Gálvez A.O., Browdy C.L, Stokes A., Venero J., Haveman J., Lewis B.J., Lawson A., Shuler A.& Leffler J.W. (2010) Photosynthesis, water respiration and growth performance of *Litopenaeus vannamei* in a super-intensive raceway culture with zero water exchange: Interaction of water quality variables. *Aquacultural Engineering* **42**, 17–24;

Wang Y. & He Z. (2009) Effect of probiotics on alkaline phosphatase activity and nutrient level in sediment of shrimp, *Penaeus vannamei*, ponds, *Aquaculture* **287**, 94–97;

Wiebe M.G. (2003) Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi – problems and improvements. *Mycology* **17**, 140 - 144;

Zar J.H. (2009) *Biostatistical analysis*. 4th. ed. New Delhi, India: Pearson Education;

Zhou Q., Li K., Jun X. & Bo L. (2009) Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. *Bioresource Technology* **100**, 3780–3786;

Considerações finais

A viabilização da utilização do biorremediador Comambio[®], específico para tratamento de efluentes domésticos, em aquicultura deverá estar associada a dois fatores:

1. Sistemas de remoção de excesso de sólidos suspensos fixos; e
2. Redução da quantidade de sólidos empregue na confecção do mesmo;

Estudos futuros deverão ser conduzidos para aprofundar o efeito da utilização contínua do biorremediador sobre as características da comunidade microbiana presente na água de cultivo, bem como seu efeito sobre aplicação pontual no cultivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21st 58d. APHA: Washington, 2005. 676 p.

AVNIMELECH, et al., Effects of aeration and mixing on nitrogen and organic matter transformations in simulated fish ponds. **Aquaculture Engineering**. v.11, p. 157–169.1992.

BURFORD, M.A., et al. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. **Aquaculture**. 219. p. 393–411. 2002.

BURFORD, M. A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero exchange system. **Aquaculture**. v. 232. p. 525 – 537. 2004.

CASTIGNETTI D., HOLLOCHER T.C. Nitrogen redox metabolism of a heterotrophic, nitrifying denitrifying *Alcaligenes sp.* from soil. Applied and Environmental Microbiology. v.44. p.923-928 1982.

CASTIGNETTI D., GUNNER, H.B. Nitrite and nitrate synthesis from pyruvic-oxime by an *Alcaligenes sp.* **Current Microbiology**. V.5 p.379-384. 1981.

D'ABRAMO L. R.FRINSKO M.O. Hybrid Striped Bass:Pond Production of Food Fish. Southern Regional. **Aquaculture Center**. N° 303. 2003.

DIEP, N.C et al. Isolation of *Pseudomonas stutzeri* in wastewater of catfish fish-ponds in the Mekong Delta and its application for wastewater treatment. **Bioresource Technology**. v.100. p.3787–3791. 2009.

EBELING, J. M. et al. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**. v.257. p. 346 – 358. 2006.

FAO. © 2006-2010. Fisheries Gateway. Aquaculture. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated 23 March 2009. [Cited 29 June 2010]. <http://www.fao.org/fishery/topic/2017/en>;

HARGREAVES, J. A. Nitrogen biogeochemistry of aquaculture ponds. **Aquaculture**. v. 166. p.181- 212. 1998.

MORIARTY, D.J.W.The Role of microorganisms in aquaculture ponds. **Aquaculture**. v.151, p. 333-349.1997.

MORIARTY, D.J.W. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. **Aquaculture**. v.164. p. 351–358.1998

PRIMAVERA, J.H.Tropical Shrimp Farming and its Sustainability. In: De Silva, S., Editor, 1998. **Tropical Mariculture**, Academic Press, London, p. 257–289.

SATYAWALI, Y., BALAKRISHNAN, M. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. **Journal of Environmental Management** v.86. p.481–497. 2008.

TENDENCIA, E. A. et al., Antibacterial activity of tilapia *Tilapia hornorum* against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture** v. 232. p.145–152. 2004.

WASIELESKY, W. et al. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *L. vannamei*. **Aquaculture**, v. 258. p. 396 – 403. 2006.

WIEBE, M.G. Stable production of recombinant proteins in filamentous fungi – problems and improvements. **Mycology**. V.17. p.140 -144. 2003.

ZHOU, et al., Role and functions of beneficial microorganisms in sustainable aquaculture. **Bioresource Technology**. v.100. p.3780–3786. 2009.

ANEXO 1 – Imagens da sala experimental e detalhes relevantes do manejo do experimento



a) Unidades experimentais utilizadas nos testes de determinação da concentração de Comambio® antes da introdução da água contendo bioflocos microbianos do cultivo superintensivo. Na parte inferior das garrafas estão localizadas as tampas das mesas e a pedra porosa em cada uma delas para promoção da aeração.

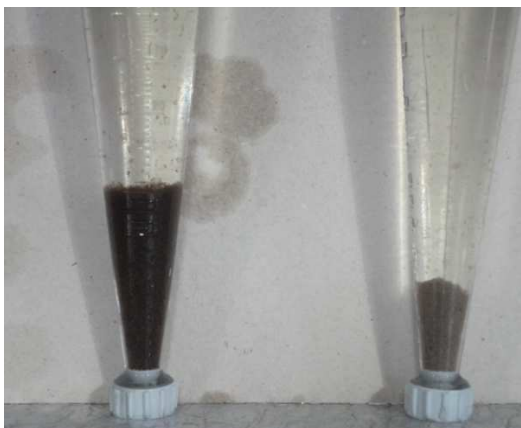


b) Unidades experimentais utilizadas para testes de determinação da concentração de Comambio®. São garrafas do tipo pets com capacidade

de 1,5 litros. Cada tratamento foi testado em quatro réplicas num delineamento ao acaso.



c) Sala experimental com instalação das unidades experimentais, 12 tanques de fibra de vidro de 900 litros cada uma, na qual foi desenvolvido o experimento da caracterização das variáveis físico-químicas do sistema de cultivo superintensivo com biofloco microbiano.



d) Imagem do cone “Inhoff” com amostra da água de cultivo superintensivo com biofloco microbiano de camarões marinhos sem e com a adição de Comambio[®], observando os cones da esquerda para direita. Na imagem pode-se verificar que para além do volume da amostra que é inferior no grupo tratado, a amostra é mais clara, sugerindo menor quantidade de matéria orgânica na amostra.



e) Unidade experimental do grupo controle 15 dias depois do início do experimento sobre caracterização das variáveis físico-químicas do sistema de cultivo superintensivo com biofloco microbiano. Controle. Nota-se a coloração da água mais escura em relação à cor da imagem (f).



f) Unidade experimental do grupo tratado com bioaumentador 15 dias depois do início do experimento sobre caracterização das variáveis físico-químicas do sistema de cultivo superintensivo com biofloco microbiano. Nota-se a coloração mais clara em relação a cor da imagem (e).



g) Unidade experimental do grupo controle durante a despesca no experimento sobre caracterização das variáveis físico-químicas do cultivo superintensivo com bioflocos microbianos. Nota-se a coloração do efluente.



h) Unidade experimental do grupo tratado com bioaumentador na despesca do experimento sobre caracterização das variáveis físico-químicas no cultivo superintensivo com bioflocos microbianos. Nota-se a coloração do efluente.



i) Camarões marinhos com peso de $24,60 \pm 0,8$ g, *Litopenaeus vannamei*, cultivado em sistema superintensivo com biofloco microbiano 30 dias depois do início do experimento.