

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Cultivo de camarão com aerador e substrato artificial,
identificação de bactérias da *wetland* construída para o
tratamento do efluente**

Matheus Nicolino Peixoto Henares

Jaboticabal, São Paulo
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Cultivo de camarão com aerador e substrato artificial,
identificação de bactérias da *wetland* construída para o
tratamento do efluente**

Matheus Nicolino Peixoto Henares

Orientador: Dr. Antonio Fernando Monteiro Camargo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor

Jaboticabal, São Paulo
2012

H493c Henares, Matheus Nicolino Peixoto
Cultivo de camarão com aerador e substrato artificial,
identificação de bactérias da wetland construída para o tratamento do
efluente. / Matheus Nicolino Peixoto Henares. -- Jaboticabal, 2012
xii, 98 f. : il.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2012
Orientador: Antonio Fernando Monteiro Camargo
Banca examinadora: Irineu Bianchini Junior, Lucia Maria Carareto
Alves, Wagner Cotroni Valenti, Sidnei Magela Thomaz
Bibliografia

1. Limnologia. 2. Carcinicultura. 3. Bactérias. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.512

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

Dedico

A meus pais, José Peixoto Henares e Albertina Maria Nicolino Henares, que em todos os momentos me apoiaram, incentivaram, compreenderam, amaram e lutaram para que a realização de mais este sonho pudesse tornar realidade. Obrigado por tudo, mas principalmente pela educação, pelo amor e carinho. A eles, todo o meu amor e carinho...

Ofereço

À minha esposa Jackeline da Silva Carvalho, pela compreensão, ajuda, amizade, amor e paciência.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Monteiro Camargo, pela orientação, pelas enriquecedoras discussões sobre os trabalhos desta Tese e outros; pelos ensinamentos, pela amizade desenvolvida durante o mestrado e o doutorado e, principalmente, pela importância de fazer ciência.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa.

Ao Prof. Dr. Wagner Cotroni Valenti pelos valiosos ensinamentos de **Ecologia** durante a graduação, pelas sugestões e discussões sobre diversos trabalhos, por ter gentilmente disponibilizado a infra-estrutura do Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), em Jaboticabal/SP para a realização dos experimentos e pela amizade.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos pelos ensinamentos de Biologia Molecular e Biotecnologia, por ter gentilmente disponibilizado a infra-estrutura do Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de UNESP Jaboticabal/SP e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini Junior e Profa. Dra. Maria Stela Maioli Castilho Noll, pela participação e importantes sugestões e considerações concedidas durante o exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Irineu Bianchini Junior, Prof. Dr. Sidnei Magela Thomaz e Profa. Dra. Lucia Maria Carareto Alves pela participação no exame de defesa e pelas correções e importantes contribuição para a melhoria de nossos trabalhos.

Aos professores e ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP.

A todos os amigos do Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP.

À Veralice e ao David, que sempre me ajudaram nesta “caminhada”

Aos amigos do Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos – UNIFEB.

Aos meus amigos moradores e ex-moradores da República Kilombo.

Aos eternos: tio Valder (Valder Batista de Freitas) e tio Carlim (Carlos Antonio Rodrigues) (*in memoriam*) pelo enorme apoio dedicado enquanto presente.

Aos membros da família Carvalho pelo apoio e compreensão.

Aos membros da família Nicolino e Peixoto pelo apoio e compreensão.

A todos os familiares e amigos!!!

Aos meus pais, sempre e em todos os momentos.

A **Deus** por tudo e em todos os momentos da minha vida...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
-----------------------	------

LISTA DE TABELAS.....	xi
-----------------------	----

Capítulo I

1. APRESENTAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE.....	01
--	----

2. INTRODUÇÃO GERAL.....	02
--------------------------	----

3. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NO CULTIVO DO <i>Macrobrachium rosenbergii</i> ..	02
---	----

4. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EFLUENTE DE AQUICULTURA.....	08
---	----

4.1 Impactos provocados pelo lançamento de efluentes de aquicultura em ambientes aquáticos.....	09
---	----

4.2 Formas de mitigação dos impactos dos efluentes de aquicultura.....	11
--	----

5. CONCEITO E UTILIZAÇÃO DAS WETLANDS CONSTRUÍDAS.....	12
--	----

6. OS MICRORGANISMOS E AS WETLANDS.....	17
---	----

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
------------------------------------	----

SUMÁRIO

Capítulo II

“ALTERAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS DO CULTIVO DE *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862) COM USO DE SUBSTRATO ARTIFICIAL E AERAÇÃO NOTURNA”

RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Análise estatística.....	40
3. RESULTADOS.....	40
4. DISCUSSÃO.....	46
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

SUMÁRIO

Capítulo III

“EFICIÊNCIA DE DIFERENTES WETLANDS CONSTRUÍDAS PARA O TRATAMENTO DO EFLUENTE DE REPRODUTORES DE *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)”

RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	55
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1 Variáveis limnológicas.....	60
2.2 Estoque de N, P e matéria orgânica (MO) acumulados nos sistemas de tratamento e na biomassa das macrófitas.....	61
2.3 Análise estatística.....	62
3. RESULTADOS.....	63
4. DISCUSSÃO.....	66
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

SUMÁRIO

Capítulo IV

“IDENTIFICAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM WETLAND CONSTRUÍDA E COLONIZADA COM *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms”

RESUMO.....	73
ABSTRACT.....	74
1. INTRODUÇÃO.....	75
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	76
2.1 Estratégia de coleta das amostras ambientais.....	77
2.2 Extração do DNA metagenômico da <i>wetland</i> e amplificação do gene <i>16S rRNA</i>	77
2.3 Clonagem e sequenciamento parcial do gene <i>16S rRNA</i>	78
2.4 Análise da Diversidade.....	79
3. RESULTADOS.....	79
4. DISCUSSÃO.....	86
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1.** Caixa gradeadora mostrando em detalhes as barras paralelas ajustáveis.....03
- Figura 2.** (A) Passagem da rede de arrasto (despesca-seletiva) para captura dos animais com tamanho comercial. (B) Diferentes morfotipos do camarão *Macrobrachium rosenbergii*: SM = *Small Male*; OC = *Orange Claw* e BC = *Blue Claw* (Ra'Anan e Cohen, 1985; Kuris et al., 1987). (C) Diferentes morfotipos do camarão *Macrobrachium amazonicum*; TC = *Translucid Claw*; CC = *Cinnamon Claw*; GC1 = *Green Claw 1*, GC2 = *Green Claw 2* (Moraes-Riodades & Valenti, 2004).....04
- Figura 3.** Substrato artificial utilizados nos viveiros de aquicultura para ampliar a área útil do viveiro de cultivo.....05
- Figura 4.** Sistemas de cultivo de camarões com aerador e substratos artificiais.....06
- Figura 5.** Esquema dos sistemas de cultivo de *Macrobrachium amazonicum*. (A) sistema de cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (SSCA); (B) sistema de cultivo com substrato artificial sem aeração noturna (CSSA); (C) sistema de cultivo sem substrato artificial sem aeração noturna (SSSA) e (D) sistema de cultivo com substrato artificial com aeração noturna (CSCA).....07
- Figura 6.** *Wetlands* construídas para o tratamento do efluente de um viveiro (200 m²) de manutenção de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii*. (A) *wetland* colonizada com *Eichhornia crassipes* e (B) *wetland* colonizada com *Salvinia molesta* (Henares, 2008).....12
- Figura 7.** Desenho esquemático da composição das diferentes *wetlands* construídas para o tratamento do efluente do viveiro de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii*. *Wetland* colonizada com *Eichhornia crassipes* (Ec); *wetland* colonizada com *Typha domingensis* (Td); sistema de tratamento por sedimentação (SE) e sistema de tratamento com solo filtrante (SF).....17

LISTA DE FIGURAS

Figura 8. (A) *Wetland* construída e colonizada com *Eichhornia crassipes* (2 m²); (B) viveiro de 212,3 m³ (193 m² de superfície e 1,1 m de profundidade) do Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP. Viveiro utilizado para a manutenção de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii*.....**20**

Capítulo II

Figura 1. Precipitação (■) e média (média do valor máximo e mínimo) da temperatura do ar (◆) nos meses de cultivo do *Macrobrachium amazonicum*. Fonte: CIIAGRO Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas.....**36**

Figura 2. Médias e desvios padrão da quantidade total de dieta fornecida nos meses de cultivo.....**37**

Figura 3. Valores médios (n=15) e desvios padrão da concentração de oxigênio dissolvido (OD) do sistema de cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (□), com substrato artificial sem aeração noturna (■), sem substrato sem aeração noturna (■) e com substrato com aeração noturna (■). Letra minúscula corresponde à comparação dos tratamentos na mesma coleta e letra maiúscula corresponde à comparação do tratamento nas diferentes coletas (Teste de Tukey – $P \leq 0,05$).....**41**

Figura 4. Valores médios (n=15) e desvios padrão da concentração de clorofila-*a*, turbidez, sólidos totais em suspensão (STS), nitrogênio Kjeldahl total (NKT), ortofosfato (P-PO₄) e fósforo total (PT) do sistema de cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (□), com substrato artificial sem aeração noturna (■), sem substrato artificial sem aeração noturna (■) e com substrato artificial com aeração noturna (■). Letra minúscula corresponde à comparação dos tratamentos na mesma coleta e letra maiúscula corresponde à comparação do tratamento nas diferentes coletas (Teste de Tukey – $P \leq 0,05$).....**43**

Figura 5. Análise de Componentes Principais das variáveis limnológicas do cultivo de *Macrobrachium amazonicum* sem substrato artificial com aeração noturna (□); com substrato artificial sem aeração noturna (■); sem substrato artificial sem aeração noturna (■); com substrato artificial com aeração noturna (■). A, B, C e D = formação de 4 grupos; 1 - 5 = coletas. Os dois componentes resumiram 81,73% da variabilidade total dos dados (CP1 = 71,39% e CP2 = 10,34%).....**46**

LISTA DE FIGURAS

Capítulo III

- Figura 1.** Precipitação (■) e média (média do valor máximo e mínimo) da temperatura do ar (◆) nos meses de realização do experimento. Fonte: CIIAGRO Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas.....58
- Figura 2.** Desenho esquemático das *wetlands* construídas para o tratamento do efluente do viveiro de manutenção dos reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii*. (●) indica pontos de coleta.....59
- Figura 3.** Desenho esquemático da composição das diferentes *wetlands*.....60
- Figura 4.** Ordenação pela Análise de Componentes Principais das variáveis limnológicas do efluente do viveiro e dos efluentes tratados. Efluente do viveiro (▲); efluente tratado no sistema Ec (○); efluente tratado por sedimentação (●); efluente tratado no Td (□); efluente tratado com solo filtrante (■). A, B, C e D = formação de 4 grupos; 1-6 = coletas. Os dois componentes explicaram 79,90% da variabilidade total dos dados (CP1 = 67,80% e CP2 = 12,10%).....64

Capítulo IV

- Figura 1.** Esquema do sistema de tratamento do efluente do viveiro.....77
- Figura 2.** Filograma das sequencias parciais do gene *16S rRNA* da biblioteca WTI. A sequencia Uncultured archaeon WSB-8 (AB055990.1) foi usado como grupo externo.....81
- Figura 3.** Filograma das sequencias parciais do gene *16S rRNA* da biblioteca WTF. A sequencia Uncultured archaeon WSB-8 (AB055990.1) foi usado como grupo externo.....82
- Figura 4.** Número de clones representativo de cada ordem na WTI (□) e WTF (■).....85
- Figura 5.** Curva de rarefação da WTI e WTF. O critério de agrupamento das sequencias de 16S rDNA utilizado para a organização das curvas de rarefação foi de 97% de similaridade.....85

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Comparação da remoção das formas de N e P obtida em diferentes estudos.....	15
--	-----------

Capítulo II

Tabela 1. Variáveis limnológicas e métodos de análises.....	39
Tabela 2. Valores médios e desvios padrão da massa seca total e do estoque de NKT e PT nos sistemas de cultivo com substrato artificial.....	40
Tabela 3. Valor de <i>F</i> e coeficiente de variação (CV) das variáveis limnológicas submetidas à Análise de Variância.....	41
Tabela 4. Coeficientes de correlação entre as variáveis limnológicas e os dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais em diferentes sistemas de cultivo de <i>Macrobrachium amazonicum</i>	44

Capítulo III

Tabela 1. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais em <i>wetlands</i> construídas para o tratamento do efluente do viveiro de manutenção de reprodutores de <i>Macrobrachium rosenbergii</i>	63
Tabela 2. Valores médios (n = 18) da carga de material particulado em suspensão (MPS), N e P no efluente do viveiro (EV) e da carga removida no sistema de tratamento com <i>Eichhornia crassipes</i> (Ec), por sedimentação (SE), com <i>Typha domingensis</i> (Td) e substrato filtrante (SF).....	65

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.** Valores médios (n = 3) e desvios padrão do estoque de nitrogênio (N), fósforo (P) e matéria orgânica (MO) acumulados nos sistemas de tratamento do efluente do viveiro.....**66**
- Tabela 4.** Valores médios (n = 3) e desvios padrão do estoque de nitrogênio (N), fósforo (P) e matéria orgânica (MO) acumulados na biomassa de *E. crassipes* e *T. domingensis*.....**66**

Capítulo IV

- Tabela 1.** Comparação dos filos e classes identificadas no início (WTI) e final (WTF) do experimento.....**84**

1. APRESENTAÇÃO E ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho é parte dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP para a obtenção do título de Doutor. Esta Tese de doutorado está dividida em 4 capítulos. O capítulo I apresenta uma introdução geral, na qual é abordada a produção mundial de organismos aquáticos, as estratégias de cultivo do camarão *Macrobrachium rosenbergii*, o impacto do lançamento do efluente de viveiro de cultivo de organismos aquáticos em ecossistemas naturais, a utilização de *wetlands* construídas para o tratamento do efluente de aquicultura e, por último, o uso da técnica de sequenciamento parcial do *gene 16S rRNA* para identificar as comunidades bacterianas em ecossistemas naturais ou construídos, como *wetlands* construídas (WC's). Os capítulos II, III e IV referem-se a experimentos desenvolvidos no Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) (21° 15'22"S e 48°18'48"W), em Jaboticabal (SP/Brasil) e foram redigidos no formato de artigo científico.

O capítulo II foi intitulado:

“ALTERAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS DO CULTIVO DE *Macrobrachium amazonicum* (HELLER, 1862) COM USO DE SUBSTRATO ARTIFICIAL E AERAÇÃO NOTURNA”

O capítulo III:

“EFICIÊNCIA DE DIFERENTES *WETLANDS* CONSTRUÍDAS PARA O TRATAMENTO DO EFLUENTE DE REPRODUTORES DE *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879)”

O capítulo IV:

“IDENTIFICAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM *WETLAND* CONSTRUÍDA E COLONIZADA COM *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms”

Capítulo I

2. INTRODUÇÃO GERAL

A captura de organismos aquáticos e a aquicultura mundial alcançaram a produção de 142 milhões de toneladas em 2008. Desse montante 115 milhões de toneladas foram utilizadas para alimentação humana. A China se destaca como o principal país produtor de pescado com 47,5 milhões de toneladas produzidas em 2008, sendo 32,7 milhões provenientes da aquicultura e 14,8 milhões de toneladas da captura pesqueira. Esses números fazem da aquicultura o setor de produção animal que mais cresce no mundo com taxa anual de 6,6% (FAO, 2010).

A produção mundial de camarões de água doce é um dos setores da aquicultura que mais cresceu entre os anos de 1995 e 2004 (Moraes-Riodades & Valenti, 2004). De acordo com a FAO (2010), a produção mundial do camarão *Macrobrachium rosenbergii* aumentou de 65.442 toneladas em 1997 para 207.749 toneladas em 2008. Somado ao cultivo de *Macrobrachium niponense* e *Macrobrachium malcolmsonii* a produção total dos camarões de água doce ultrapassou 412 mil t ano⁻¹. No Brasil, a produção de *M. rosenbergii* foi de 250 toneladas em 2008 (FAO, 2010).

O aumento na produção de organismos aquáticos se deve, dentre diversos fatores, ao crescimento da população mundial com taxa média anual de 1,6% entre 1970 e 2008 (FAO, 2010) e ao desenvolvimento das tecnologias de cultivo (Valenti & Tidwell, 2006), que possibilitam intensificar o sistema de produção com altas densidades de estocagem e gastos com energia, fertilizantes e alimentação comercial (Moraes-Riodades et al., 2006). O crescimento populacional, nas últimas décadas, tem ocasionado a redução da captura pesqueira e um aumento da obtenção do pescado por meio da aquicultura (FAO, 2010). Até 1950 a aquicultura produzia menos 1 tonelada por ano e em 2008 a produção alcançou 52,5 milhões de toneladas movimentando aproximadamente US\$ 98,4 bilhões. A maior parte dessa produção está concentrada na Ásia, que se destaca devido à produção da China com 62 e 51% da produção mundial e movimentação financeira, respectivamente (FAO, 2010).

3. ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NO CULTIVO DO *Macrobrachium rosenbergii*

Entre as tecnologias desenvolvidas para intensificar a produção, o gradeamento de juvenis, a prática de despesca-seletiva e o uso de substrato artificial são técnicas utilizadas

no cultivo de *M. rosenbergii* para reduzir a variabilidade do tamanho dos animais e aumentar a produtividade (Tidwell & D'Abramo, 2010; Moraes-Valenti & Valenti, 2010).

O gradeamento de juvenis e o uso de despescas-seletivas permitem obter populações com tamanho mais homogêneo (Karplus et al., 2000). Os substratos artificiais são anteparos (naturais ou artificiais) colocados no interior do tanque e/ou viveiro de cultivo para ampliar a área útil do local.

O gradeamento consiste em aleatorizar parte da população inicial e submetê-la à seleção em diferentes classes de tamanho, geralmente utilizando-se caixas com barras paralelas de abertura ajustável ao tamanho da população inicial (Figura 1). Os animais retidos nas barras da caixa gradeadora são chamados de “uppers” e os que passam pelas barras de “lowers”. Deste modo obtém-se populações com tamanho mais homogêneo e evita-se a inibição do crescimento dos indivíduos com tamanhos reduzidos por parte dos animais dominantes (Tidwell & D'Abramo, 2010).



Figura 1. Caixa gradeadora mostrando em detalhes as barras paralelas ajustáveis.

A despescas-seletiva consiste na retirada de machos dominantes que já apresentam tamanho comercial (Figura 2A). Para o *M. rosenbergii* o peso comercial varia conforme a região, mas é em média de 20 a 30 g (Valenti – informação pessoal), enquanto para o *Macrobrachium amazonicum* é 7 g (Moraes-Riodades & Valenti, 2004). A retirada dos animais com tamanho comercial contribui para a regularidade do produto no mercado e eleva a taxa de crescimento dos camarões de morfotipos inferiores (Moraes-Valenti & Valenti, 2010) (Figura 2B e 2C). Além dessa vantagem, a estratégia de despescas permite aumentar a sustentabilidade social do cultivo, pois maior quantidade de mão-de-obra é

empregada para realizá-la. Como desvantagem, pode-se ressaltar o revolvimento do fundo do viveiro que aumenta a turbidez e a concentração de sólidos totais em suspensão (STS) na coluna d'água. O aumento dos STS prejudica o desenvolvimento da comunidade fitoplanctônica devido à redução da entrada de luz, da comunidade bentônica (Keppeler & Valenti, 2006) e, inclusive dos camarões por obstrução das brânquias.

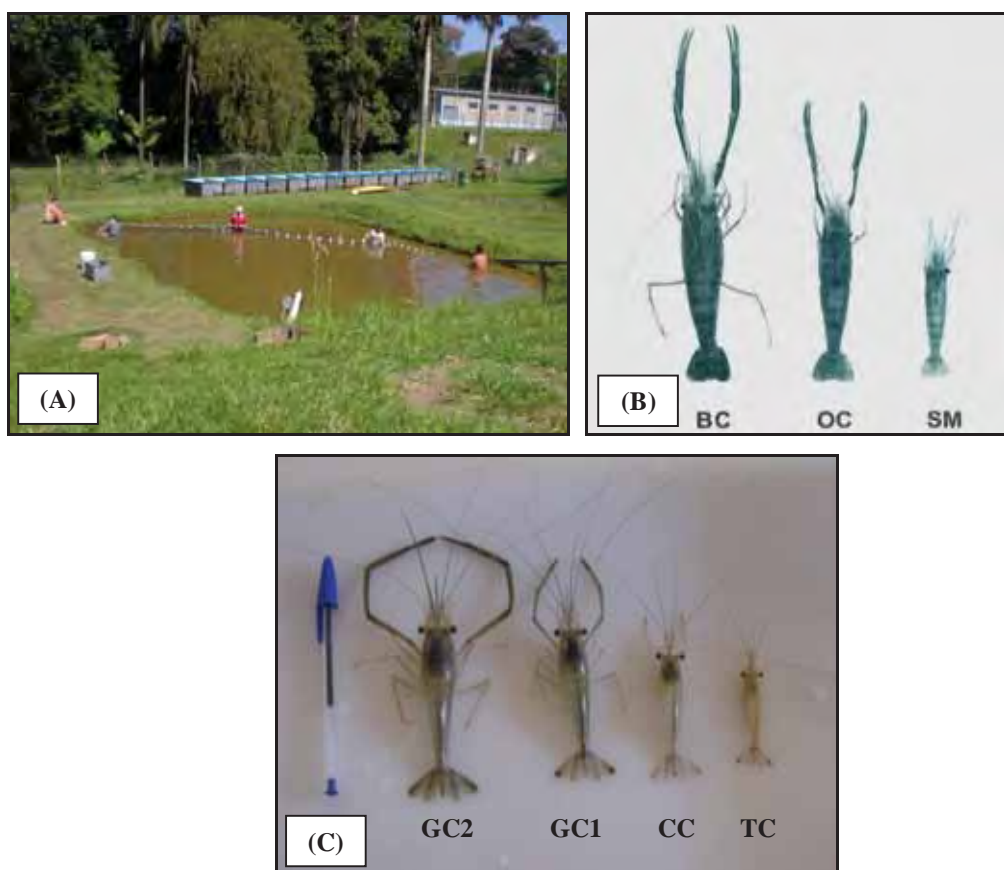


Figura 2. (A) Passagem da rede de arrasto (despesca-seletiva) para captura dos animais com tamanho comercial. (B) Diferentes morfotipos do camarão *Macrobrachium rosenbergii*: SM = *Small Male*; OC = *Orange Claw* e BC = *Blue Claw* (Ra'Anan e Cohen, 1985; Kuris et al., 1987). (C) Diferentes morfotipos do camarão *Macrobrachium amazonicum*; TC = *Translucid Claw*; CC = *Cinnamon Claw*; GC1 = *Green Claw 1*, GC2 = *Green Claw 2* (Moraes-Riodades & Valenti, 2004).

Os substratos artificiais possibilitam aumentar a área útil do viveiro e, conseqüentemente, o peso médio individual, a densidade de estocagem, reduz a competição entre os animais e melhora a conversão alimentar devido ao desenvolvimento de alimento natural na superfície do material adicionado (Tidwell et al., 2000) (Figura 3).



Figura 3. Substrato artificial utilizado nos viveiros de aquicultura para ampliar a área útil do viveiro de cultivo.

O uso de substrato artificial reduziu os efeitos negativos do crescimento heterogêneo em *M. rosenbergii* elevando a produtividade em 24% (Tidwell & D'Abramo, 2010). No cultivo de camarões, o uso de substrato também evita os confrontos agonísticos, melhora o bem estar animal e possibilita maior intensificação do cultivo (Tidwell et al., 2001). Além disso, melhora a qualidade da água e reduz a conversão alimentar devido ao acúmulo de perifíton, que absorve compostos nitrogenados e serve de alimento aos camarões (Tidwell et al., 2001; Azim & Wahab, 2005). A assembleia de perifíton é um importante componente dos ecossistemas aquáticos, pois absorve N e P da coluna d'água (Blumenshine et al., 1997) e atua como componente chave no metabolismo do ecossistema aquático, compreendendo a base da cadeia alimentar (Fink & Von Elert, 2006).

Diversos estudos realizados com uso de substrato na aquicultura têm reportado a melhora da qualidade da água de cultivo e o aumento na produção de camarões de água doce e peixes (Wahab et al., 1999; Keshavanath et al., 2004; Uddin et al., 2009). No cultivo de *M. rosenbergii* em viveiros com substrato artificial houve redução de 48% da conversão alimentar que passou 2,5 para 1,2 e aumento da produtividade de 1342 para 2404 kg ha⁻¹ (Tidwell & Coyle, 2008). O uso do substrato artificial no cultivo de *M. rosenbergii* reduziu a concentração de N-NH₃ de 0,059 para 0,038 mg L⁻¹ e de N-NO₂ de 0,075 para 0,044 mg L⁻¹ (Asaduzzaman et al., 2009).

Juntamente com os substratos podem ser utilizados aeradores nos viveiros de cultivo (Figura 4). O aerador mantém a concentração de oxigênio dissolvido em níveis mais

elevados, principalmente em sistemas com elevadas densidades de estocagem. Diversos estudos demonstraram os benefícios do uso do aerador no crescimento e produtividade dos organismos aquáticos (Thomforde & Boyd, 1991; Inoue et al., 2003; Pawar et al., 2009).



Figura 4. Sistemas de cultivo de camarões com aerador e substratos artificiais.

O uso de aeradores implica em consumo maior de energia, porém, além de manter a concentração de oxigênio dissolvido em níveis mais elevados, possibilita a redução da taxa de renovação da água, o que reduz os impactos ocasionados pelo lançamento dos efluentes. No cultivo de animais bentônicos, como os camarões, o uso de aerador também reduz a estratificação vertical da coluna d' água, formando um habitat mais favorável ao crescimento e desenvolvimento dos animais (Rogers & Fast, 1988).

Considerando as informações sobre os sistemas e estratégias de cultivo de organismos aquáticos, o capítulo II desta Tese foi elaborado com o objetivo de avaliar as alterações das características limnológicas da água de cultivo do *Macrobrachium amazonicum* com aeração noturna e uso de substrato artificial. Em todos os viveiros utilizados no experimento foram instalados aeradores e estes acionados entre 12h00 e 14h00 para reduzir a estratificação térmica da água. Entretanto, para avaliar o efeito da aeração noturna dois tratamentos também tiveram os aeradores acionados entre 02h00 e 05h00 para manter as concentrações de oxigênio dissolvido sempre elevada. Portanto, foram testados 4 sistemas de cultivo (tratamentos). Os tratamentos foram: sistema de cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (SSCA); sistema de cultivo com substrato artificial sem aeração noturna (CSSA); sistema de cultivo sem substrato artificial

sem aeração noturna (SSSA) e sistema de cultivo com substrato artificial com aeração noturna (CSCA) (Figura 5).

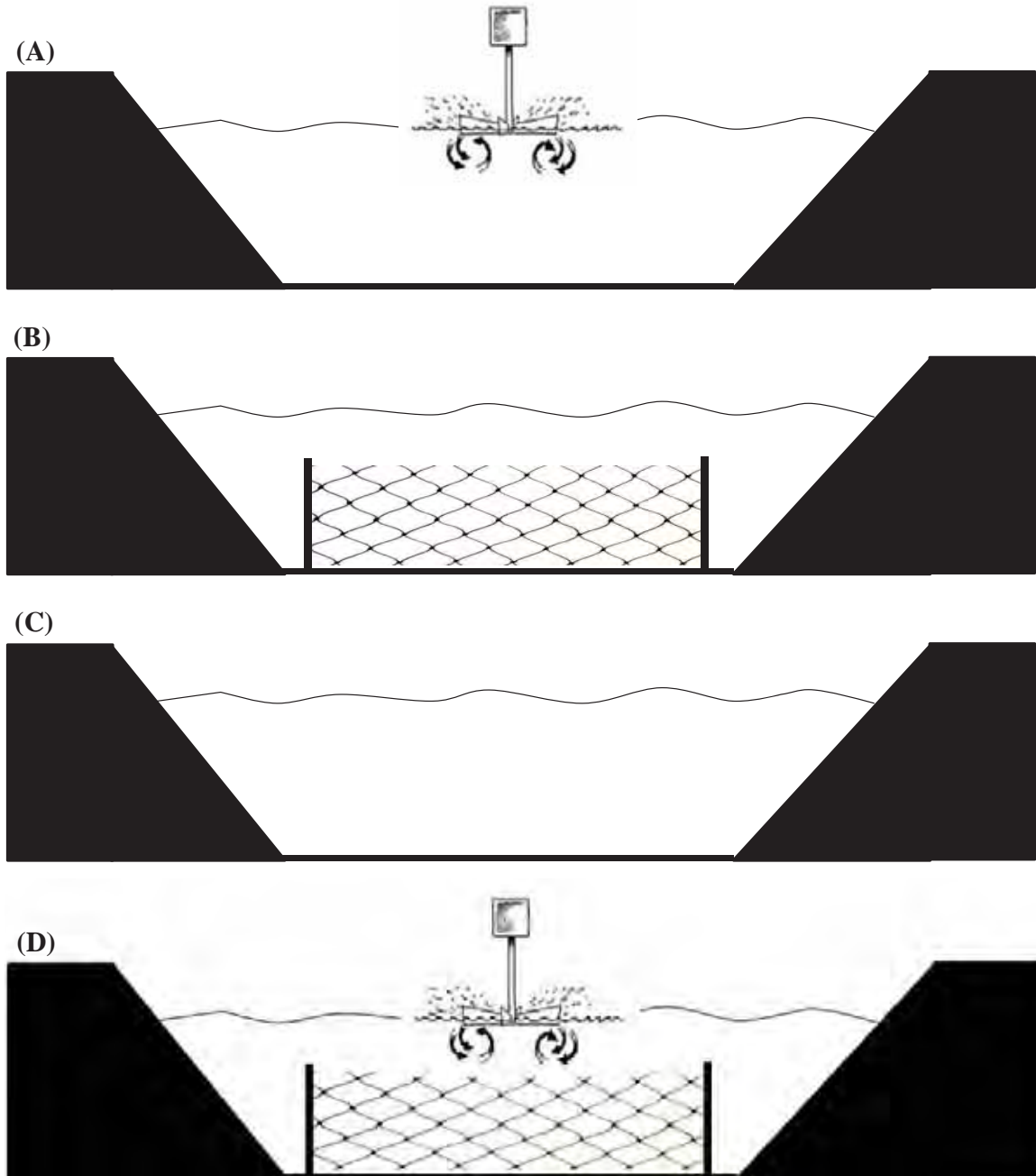


Figura 5. Esquema dos sistemas de cultivo de *Macrobrachium amazonicum*. (A) sistema de cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (SSCA); (B) sistema de cultivo com substrato artificial sem aeração noturna (CSSA); (C) sistema de cultivo sem substrato artificial sem aeração noturna (SSSA) e (D) sistema de cultivo com substrato artificial com aeração noturna (CSCA).

4. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EFLUENTE DE AQUICULTURA

Os efluentes de cultivo de organismos aquáticos são gerados devido à constante renovação da água dos viveiros para garantir a qualidade da água em níveis adequados ao crescimento dos animais (Boyd & Queiroz, 2004). Neste processo, os efluentes ricos em N, P, material particulado em suspensão (MPS) e matéria orgânica provocam alterações nas variáveis limnológicas da água (Páez-Osuna, 2001; Cohen et al., 2005; Sindilariu et al., 2007). Quando lançado continuamente, sem tratamento adequado, nos ecossistemas aquáticos, o efluente da aquicultura pode acelerar o processo de eutrofização dos corpos d' água receptores (Páez-Osuna, 2001) provocando alterações negativas nas comunidades desses ecossistemas.

A dieta e os fertilizantes são os principais responsáveis pelo aumento da concentração de N, P e matéria orgânica nos viveiros de cultivo (Boyd, 2003). Páez-Osuna et al. (1997) e Boyd e Tucker (1998) relataram que apenas 25 a 30% do N e P fornecido na dieta estão presentes na biomassa dos animais no momento da despesca. Jackson et al. (2003) estimaram que 21 a 22% do N e apenas 6% do P são assimilados pelo camarão. O restante forma os detritos, é retido no sedimento dos viveiros, é absorvido pela biota aquática ou é transportado para fora do viveiro no efluente. A perda de N e P no efluente de viveiros de cultivo de camarão, em cada ciclo de produção, foi estimada em 52 e 8,4 kg ha⁻¹, respectivamente (Paez-Osuna et al., 1997). Além do N que se acumula no sedimento ou é lançado para fora do viveiro no efluente, há também o N lançado para a atmosfera pela volatilização da NH₃ (Sooknah & Wilkie, 2004).

Entre os principais compostos nitrogenados estão o nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) e o nitrito (N-NO₂) (Shishehchian et al., 1999). Este, um composto intermediário da oxidação da amônia à nitrato (N-NO₃) (Midlen & Redding, 2000), é observado em águas com elevadas concentrações de nutrientes ou em camadas de água mais profundas onde a decomposição aeróbica leva ao seu acúmulo (Ono & Kubitza, 2003). O N-amoniacal é um produto da excreção nitrogenada e também da decomposição aeróbica (Boyd & Zimmermann, 2010). Chen & Kou (1996) constataram que a principal forma de N excretada é amônia (45 a 78%) e, em menores quantidades N-NO₂, N-NO₃ e formas orgânicas solúveis como uréia, aminoácidos e ácido úrico.

Fósforo é o principal nutriente limitante ao desenvolvimento das macrófitas aquáticas e ao fitoplâncton (Tundisi & Tundisi, 2008). Entre as formas de P, as formas solúveis de P-ortofosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) assumem maior relevância por serem as principais formas assimiladas pelos vegetais aquáticos (Esteves & Panosso, 2011). Fósforo total (PT) também representa um fator importante na classificação dos corpos d'água no Brasil. A Resolução N° 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) atribui, entre outras variáveis, a concentração de PT para a classificação dos corpos hídricos do país. Para corpos hídricos inseridos na classe 1 e 2 a concentração de PT não deve ultrapassar $0,020 \text{ mg L}^{-1}$ em ambientes lênticos e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ em ambientes lóticos. Para corpos d'água inseridos na classe 3, as concentrações de PT não devem exceder 0,05 e $0,150 \text{ mg L}^{-1}$ para ambientes lênticos e lóticos, respectivamente.

A decomposição da matéria orgânica (fezes, restos de animais mortos, alimento fornecido e não consumido) favorece o aumento da concentração de N e P, pois durante esse processo há liberação de formas solúveis de N (ex. nitrito, nitrato, amônio, aminoácidos) e P (ex. ortofosfatos, fosfoproteínas, fosfolipídeos) (Mires, 1995).

4.1 Impactos provocados pelo lançamento de efluentes de aquicultura em ambientes aquáticos

Os efluentes dos viveiros de aquicultura apresentam características distintas, de acordo com o sistema utilizado. Em sistemas extensivos, as características dos efluentes gerados tendem a ser semelhantes às características da água captada para o abastecimento dos tanques e viveiros (Stickney, 1979). Porém, isto ocorre somente com a utilização de manejos que utilizam fertilizantes em quantidades adequadas, redução, quando possível, do volume de efluente produzido e fornecimento de dietas com alta digestibilidade e estáveis na água (Boyd, 2003). Com a intensificação do sistema de produção há maiores gastos com dietas e fertilizantes. Dessa forma, independente do sistema de produção, o lançamento do efluente sem tratamento adequado em ecossistemas aquáticos naturais pode resultar em alterações nas características físicas, químicas e biológicas do meio (Redding et al., 1997). Boyd (2003) ressalta que os impactos do cultivo de organismos aquáticos nas características limnológicas da água utilizada nos viveiros dependem da espécie cultivada, intensidade de produção, manejo alimentar e tecnologia empregada.

Diversos estudos evidenciam os impactos ambientais decorrentes dos lançamentos dos efluentes de aquicultura. Em Bangucoque na Tailândia o lançamento de efluente de carcinicultura provocou floração de algas e morte de organismos coralinos (Chua et al., 1989). Efluentes de fazendas de cultivo de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) reduziram a diversidade de macroinvertebrados bentônicos nos trechos dos rios onde os efluentes foram lançados (Loch et al., 1996). Boaventura et al. (1997) observaram aumento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) devido às elevadas concentrações de bactérias heterotróficas em ambientes aquáticos que recebiam efluentes do cultivo de truta arco-íris (*O. mykiss*). Elevadas concentrações de fitoplâncton em corpos d' água receptores de efluentes de carcinicultura foram observadas por Mckinnon et al. (2002). Páez-Osuna (2001) relatou migração de crustáceos e peixes de regiões de rios que recebiam efluentes de carcinicultura. De acordo esse autor, peixes e crustáceos que nas fases jovens habitavam mangues próximos às fazendas de cultivo de camarão não foram mais encontrados nesses ambientes devido às alterações provocadas pelo lançamento de efluentes de viveiros de cultivo. Samocha e Lawrence (1997) constataram maiores concentrações de sólidos suspensos (SS) e nutrientes (N e P) à 400 metros do ponto de lançamento do efluente. Os efluentes dos viveiros de cultivo de camarões resultam em efeitos negativos na qualidade da água e no sedimento, pois reduzem a concentração de oxigênio dissolvido, causam toxicidade e *bloom* de diversas espécies de algas (Burford & Glibert, 1999).

Redução na concentração de oxigênio dissolvido e aumento dos valores de condutividade elétrica, concentrações de N, P e MPS foram observados por Henry-Silva e Camargo (2008) no efluente de viveiro de reprodutores de *M. amazonicum* e por Biudes et al. (2011) e Henares et al. (2011) no efluente de reprodutores de *M. rosenbergii*. O aumento da concentração de N e P em decorrência do lançamento do efluente do cultivo de camarões *Penaes monodon*, em manguezais no norte da Austrália, resultou no incremento da biomassa de fitoplâncton (Trott & Alongi, 2000). A represa que recebe efluente do Setor de Piscicultura e Ranicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) (21° 18' S e 48°18' W) SP/Brasil foi classificada por Pistori et al. (2010) como hipereutrófica devido às elevadas concentrações de N, P e clorofila-*a* e aos elevados valores de turbidez, condutividade elétrica e alcalinidade.

Além das alterações das características físicas, químicas e biológicas dos ecossistemas aquáticos, a eutrofização desses ambientes pode acarretar em efeitos negativos ao homem. Dentre eles, a floração de espécies de cianobactérias que produzem e liberam toxinas para o meio (Calijuri et al., 2006). A proliferação dessas cianobactérias aumenta os custos referentes ao tratamento da água para o abastecimento devido à necessidade de incrementar o nível da tecnologia utilizada para a remoção de nutrientes, organismos patogênicos e matéria orgânica (Tundisi, 2003).

4.2 Formas de mitigação dos impactos dos efluentes de aquicultura

A renovação da água de cultivo prejudica a sustentabilidade da aquicultura devido aos elevados custos ambientais provocados pelo lançamento do efluente dos viveiros (Boyd & Queiroz, 2004). As medidas para mitigar os impactos ambientais provocados pelo lançamento de efluentes de aquicultura nos ambientes aquáticos podem ser divididas em soluções anteriores e posteriores à geração dos efluentes. As soluções anteriores envolvem medidas que reduzem as concentrações de N, P, matéria orgânica e sólidos suspensos com adoção de boas práticas de manejo (BPMs) tais como: (a) uso de fertilizantes em quantidades adequadas; (b) densidades de estocagem e taxas de alimentação que não excedam a capacidade de assimilação dos nutrientes nos viveiros; Boyd e Queiroz (2004) relataram que os viveiros de cultivo de organismos aquáticos são eficientes na assimilação dos aportes de carbono, N e P; (c) fornecimento de dietas de elevada qualidade e digestibilidade, estáveis na água e sem excesso de N e P; (d) redução do volume de efluente produzido, sem prejuízo à qualidade da água utilizada no cultivo e (e) quando possível, realizar despescas sem drenagem parcial ou total dos viveiros (Boyd, 2003).

As soluções posteriores à geração do efluente são restritas ao tratamento do efluente visando a remoção da carga de N, P matéria orgânica e sólidos suspensos. Neste caso, é possível a utilização de tanques de sedimentação (Teichert-Coddington et al., 1999; Ebeling et al., 2006) e de *wetlands* construídas (Lin et al., 2005; Hadad et al., 2006; Henry-Silva & Camargo, 2006 e 2008; Sindilariu et al., 2007).

5. CONCEITO E UTILIZAÇÃO DAS WETLANDS CONSTRUÍDAS

Wetlands construídas são alagados artificiais onde os microrganismos (aeróbios e anaeróbios) e as macrófitas aquáticas promovem a remoção de nutrientes dos efluentes (Figura 6). Esses sistemas foram desenhados e construídos para o tratamento de efluentes domésticos e industriais visando, principalmente, a remoção da matéria orgânica e a redução das concentrações das diferentes formas de N e P por meio da transformação e mineralização da matéria orgânica (realizada pelos microrganismos) e absorção do N e P pelas macrófitas aquáticas (Cooper & Findlater, 1990).



Figura 6. *Wetlands* construídas para o tratamento do efluente de um viveiro (200 m²) de manutenção de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii*. (A) *wetland* colonizada com *Eichhornia crassipes* e (B) *wetland* colonizada com *Salvinia molesta* (Henares, 2008).

No interior das *wetlands* vários processos biológicos e abióticos regulam a remoção de nutrientes e sólidos suspensos do efluente (Kadlec & Knight, 1996; USEPA, 2000). Os principais processos biológicos são: mineralização e transformação da matéria orgânica e absorção do N e P pelas macrófitas (ex: amonificação e nitrificação) (USEPA, 2000). A absorção ocorre principalmente pelo sistema radicular das plantas e em algumas espécies pelas folhas (Esteves & Panosso, 2011). A absorção do fósforo associado às folhas é realizada em maior escala pela microbiota epifítica (comunidade aquática que utiliza as macrófitas aquáticas como substrato para fixação) (Wetzel, 2001). Os principais processos abióticos que atuam na remoção dos sólidos são a sedimentação e a adsorção às macrófitas e outros substratos (Lin et al., 2002; Ebeling et al., 2006).

O tratamento de efluentes com *wetlands* construídas apresenta moderado custo de instalação, baixo consumo de energia, fácil operação e manutenção (Kadlec & Knigh, 1996; Solano et al., 2004), além da possibilidade de aproveitamento da biomassa vegetal excedente (Henry-Silva et al., 2006; Biudes et al., 2009). Entretanto, é importante ressaltar que os processos de remoção de nutrientes nesses sistemas ocorrem, não somente pela absorção do N e P pelas plantas, mas também por meio da combinação de mecanismos físicos, químicos e biológicos.

Wetlands construídas são classificadas de acordo com o grupo ecológico (flutuante, emersa, submersa, com folhas flutuantes) da macrófita aquática predominante (Vymazal, 1998). Independente do grupo ecológico da macrófita, as principais características para contribuir positivamente para o desempenho da *wetland* são: (i) rápido crescimento das plantas; (ii) elevada taxa de assimilação de nutrientes; (iii) elevada capacidade de estocar nutrientes na biomassa; (iv) tolerância às características físicas e químicas do efluente e (v) tolerância às condições climáticas locais (Tanner, 1996).

Wetlands têm sido utilizadas no tratamento de efluente em diversas partes do mundo desde 1950 (Verhoeven & Meuleman, 1999). Diversos trabalhos comprovam a eficiência das *wetlands* construídas no tratamento de resíduos ácidos de mineração, efluentes agrícolas, industriais, domésticos, efluentes de aquicultura (Sindilariu et al., 2007; Chung et al., 2008; Zachritz et al., 2008; Konnerup et al., 2011) e também na remoção de alguns organismos patogênicos (Vacca et al., 2005; Pinto et al., 2009). Na aquicultura, as *wetlands* possibilitam reutilizar a água no próprio sistema de cultivo (Lin et al., 2005), o que pode aumentar a sustentabilidade da atividade.

Macrófitas aquáticas emersas arranjadas em série para o tratamento do efluente de bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) removeram até 81% do N-amoniaco, até 98% do N-nitrito; 51-75% do nitrogênio total (NT); 45-61% de PT e 75-87% do STS (Schwartz & Boyd, 1995). Na avaliação da eficiência de uma *wetland* colonizada com macrófitas emersas (*Ipomoea aquatica* e *Paspalum vaginatum*) para o tratamento do efluente de *Chanos chanos*, Lin et al. (2002) observaram remoção de N-amoniaco, N-NO₂ e N-NO₃ acima de 68% e de P-PO₄ entre 32 e 71% (Tabela 1).

No tratamento do efluente de viveiros de truta arco-íris (*O. mykiss*) com *wetland* povoada com macrófita aquática emersa (*Phragmites australis*), Schulz et al. (2003)

encontraram remoção de STS entre 95,8 a 97,3%; de NT entre 49,0 e 68,5% e de PT entre 20,6 e 41,8%. Para esses autores a eficiência de remoção do N e P pode estar relacionada ao tempo de residência do efluente nas *wetlands*. O sistema de tratamento do efluente de viveiros de camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei* colonizados com macrófitas emersas (*Typha angustifolia* e *Phragmites australis*) dispostas em série possibilitou a remoção de N-amoniaco entre 64 e 66% e de N-NO₂ entre 83 e 94% (Lin et al., (2005) (Tabela 1). Esses autores ainda observaram remoção de STS entre 55 e 66% e demanda bioquímica de oxigênio (DBO) entre 37-54%.

O tratamento do efluente de reprodutores de *M. amazonicum* (85,7 g m²) com *E. crassipes* e *P. stratiotes* dispostas em série (Henry-Silva & Camargo, 2008) foi mais eficiente na remoção de N e P do que o sistema com *E. crassipes* e *S. molesta* (em série) utilizado por Henares (2008) no tratamento do efluente de reprodutores de *M. rosenbergii* (Tabela 1). A menor eficiência deste sistema ocorreu, provavelmente, devido à utilização da *S. molesta* e à maior quantidade de matéria orgânica proveniente da maior biomassa estocada (403,2 g m⁻² e 547,9 g m⁻²). O aumento da biomassa cultivada exige incremento da quantidade de dieta fornecida, que favorece o aumento da concentração de nutrientes no efluente dos viveiros (Lin et al., 2005). De fato, a quantidade de dieta fornecida por Henares (2008) (1556 g dia⁻¹ e 2115 g dia⁻¹) foi em média 2,7 vezes maior em relação à fornecida por Henry-Silva e Camargo (2008) (685,6 g dia⁻¹). Schulz et al. (2003) também observaram variação da eficiência de *wetlands* em função da biomassa estocada e do tempo de residência do efluente no sistema. O tratamento do efluente de viveiros de cultivo de tilápia vermelha (*O. mossambicus* x *O. aureus*) estocadas em densidade maior que 30 kg m³ resultou na remoção de 4,5% de N-amoniaco e aumento de PT após o efluente passar pelo sistema de tratamento (Zachritz et al., 2008). Esses autores também atribuíram a baixa eficiência na remoção de N-amoniaco e PT à densidade de estocagem das tilápias. A comparação da eficiência de *wetlands* construídas com diferentes grupos ecológicos de macrófitas aquáticas é apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Comparação da remoção das formas de N e P obtida em diferentes estudos.

Variáveis limnológicas	Wetlands				
	Porcentagem de remoção				
N-NH ₃	86 – 98	-	64 – 66	32,3 - 34,7	2,54* – 34,1
N-NO ₂	< 99	-	83 – 94	51,1 – 54,5	19,4 – 37,2
N-NO ₃	68 – 99	-	2,4* – 5,4*	38,8 - 41,3	21,9 – 48,4
NKT	-	48 – 95	-	38,3 - 40,4	32,5 – 43,7
P-PO ₄	31,9 – 71,2	91	4,0* – 7,6*	-	23,8 – 44,4
PD	-	-	-	46,2 - 48,0	20,1 – 40,2
PT	-	86	-	69,9 – 72,5	14,3 – 43,6
Macrófitas aquáticas	<i>Ipomea aquatica</i> , <i>Paspalum vaginatum</i> e <i>Phragmites australis</i>	<i>Typha latifolia</i> e <i>Phragmites australis</i>	<i>Typha angustifolia</i> e <i>Phragmites australis</i>	<i>Eichhornia crassipes</i> e <i>Pistia stratiotes</i>	<i>Eichhornia crassipes</i> e <i>Salvinia molesta</i>
Grupos ecológicos	Emersas	Emersas	Emersas	Flutuantes	Flutuantes
Autores	Lin et al. (2002)	Naylor et al. (2003)	Lin et al. (2005)	Henry-Silva & Camargo (2008)	Henares (2008)

* indicam acréscimo da concentração do nutriente após a passagem pela *wetland*. N-NH₃ = N-amoniaco, N-NO₂ = N-nitrito, N-NO₃ = N-nitrato, NKT = nitrogênio Kjeldahl total, P-PO₄ = P-ortofosfato, PD = fósforo dissolvido e PT = fósforo total.

Henry-Silva & Camargo (2006) avaliaram a eficiência de *wetlands* construídas e colonizadas com macrófitas aquáticas flutuantes no tratamento do efluente de tilápia-do-nylo (*O. niloticus*). Os autores constataram que *wetlands* povoadas com *E. crassipes* e *P. stratiotes* foram mais eficientes na remoção de NT (46,1 e 43,9%, respectivamente) e PT (82,0 e 83,3%, respectivamente) do que a *wetland* povoada com *Salvinia molesta* (42,7% de NT e 72,1% de PT). Macrófitas aquáticas como *E. crassipes* e *P. stratiotes* são mais eficientes no tratamento de efluentes de aquicultura, pois apresentam rápido crescimento vegetativo e elevada capacidade de produzir biomassa (Henry-Silva & Camargo, 2006). Petrucio & Esteves (2000) avaliaram a taxa de absorção de N e P por *E. crassipes* e *Salvinia auriculata*, provenientes de um lago no Rio de Janeiro, e comprovaram maior eficiência na absorção dos nutrientes pela *E. crassipes* do que pela *S. auriculata*.

A eficiência das *wetlands* construídas pode variar em função do tempo de residência do efluente no sistema, das espécies e dos grupos ecológicos das macrófitas utilizadas. Diversos estudos foram realizados comparando sistemas de tratamento com macrófitas aquáticas de diferentes espécies, porém pertencentes ao mesmo grupo ecológico. Estudos comparando a eficiência de macrófitas de diferentes grupos ecológicos são escassos. Redding et al. (1997) testaram a eficiência de macrófitas aquáticas diferentes grupos ecológicos para o tratamento do efluente de cultivo de tilápia-do-nylo (*O. niloticus*). Os autores concluíram que *wetland* colonizada com *Rorippa nasturtium-aquaticum* (emersa) foi mais eficiente na remoção de N e P do que *wetlands* povoadas com *Azolla filiculoides* (flutuante) e *Elodea muttalli* (submersa).

Neste contexto, o capítulo III desta Tese foi elaborado com o objetivo de avaliar a eficiência de *wetlands* construídas e colonizada com macrófita aquática flutuante e macrófita aquática emersa para o tratamento do efluente de um viveiro de manutenção de reprodutores do camarão *M. rosenbergii*. Os sistemas de tratamento foram constituídos por tanques de fibra de vidro com 2 m³ (1 m de largura, 1 m de altura e 2 m de comprimento). Foram testadas as seguintes *wetlands* (tratamentos): sistema de tratamento com *Eichhornia crassipes* (Ec); sistema de tratamento com *Typha domingensis* (Td); sistema de tratamento por sedimentação (SE) e sistema de tratamento com solo filtrante (SF) (Figura 7).

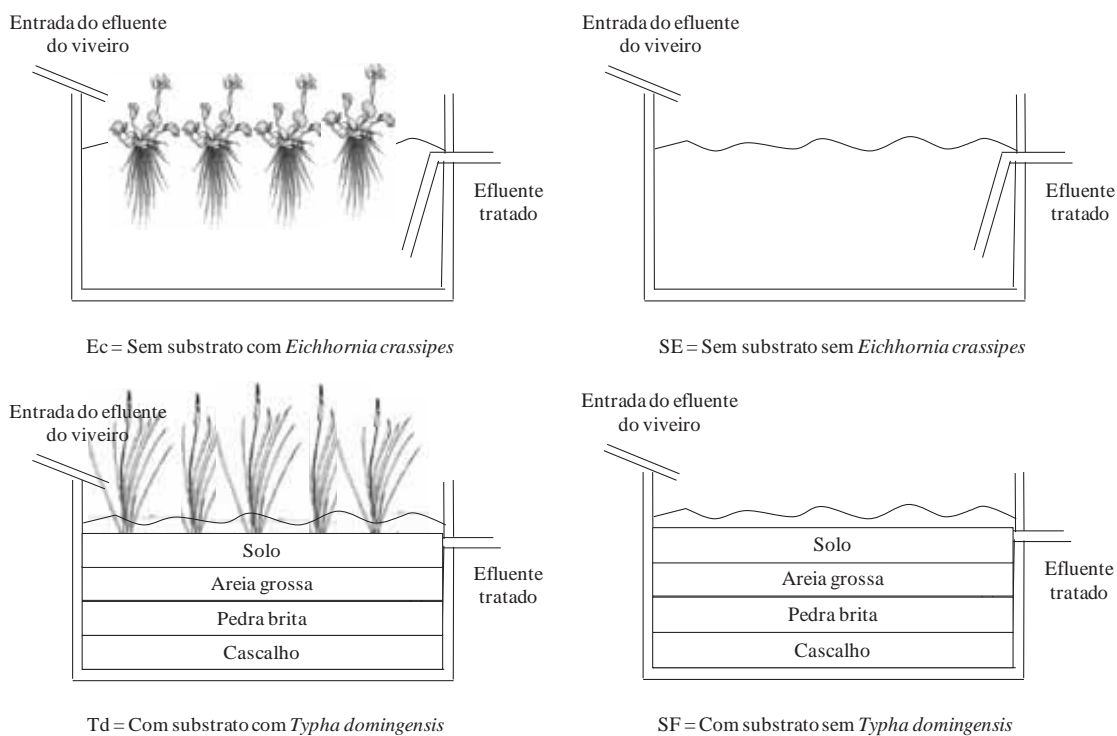


Figura 7. Desenho esquemático da composição das diferentes *wetlands* construídas para o tratamento do efluente do viveiro de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii*. *Wetland* colonizada com *Eichhornia crassipes* (Ec); *wetland* colonizada com *Typha domingensis* (Td); sistema de tratamento por sedimentação (SE) e sistema de tratamento com solo filtrante (SF).

6. OS MICRORGANISMOS E AS WETLANDS

Os microrganismos são importantes componentes dos ecossistemas aquáticos, pois fazem parte da rede alimentar e desempenham papel fundamental no processo de produção primária e decomposição. As transformações da matéria orgânica por meio do metabolismo microbiano são importantes nos ciclos biogeoquímicos e no fluxo de energia dos ecossistemas aquáticos (Moriarty, 1997; Stottmeister et al., 2003).

Nas *wetlands* construídas, assim como nos viveiros de cultivo de organismos aquáticos, os microrganismos desempenham papel importante com relação às transformações e mineralizações do N, P, matéria orgânica e carbonatos, à produtividade, à nutrição dos animais cultivados e à qualidade da água. No entanto, só recentemente os estudos relacionados às espécies, à diversidade e a interação dos microrganismos com o meio abiótico e outros componentes da biodiversidade aquática tem se intensificado. Em

lagos eutrofizados no leste da China foram identificados diversos filos pertencentes ao domínio Bactéria (Wu et al., 2007). Em *wetlands* localizadas em regiões agrícola no leste de Calcutta, na Índia, foram identificados os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Ghosh et al., 2007). Os táxons *Gamaproteobacteria*, *Firmicutes Alphaproteobacteria*, *Sphingobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* também foram identificados em *wetlands* construídas para o tratamento de efluente industrial (Calheiros et al., 2009). No solo diversos estudos já foram realizados, em diversas regiões geográficas (Borneman et al., 1996; Rondon et al., 2000; Nogales et al., 2001; Furlong et al., 2002). No Brasil, os filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* foram identificados em solos utilizados para agricultura (tomates, feijão, milho e soja) (Pereira et al., 2006) e solos de floresta nativa e de plantio de eucalipto (*Eucalyptus* sp) (Silveira et al., 2006).

Os métodos tradicionais para o conhecimento dos microrganismos presentes na água limitam-se à análise daqueles que podem crescer em condições laboratoriais, os quais representam apenas 1% da biodiversidade natural (Rondon et al., 2000). A identificação de um número restrito de microrganismos pode ocasionar perdas de informações relevantes sobre a diversidade e as interações biológicas que ocorrem em um determinado habitat. Portanto, não é surpreendente que poucas observações importantes relacionadas à ecologia microbiana antecederam às técnicas moleculares, uma vez que, antes destas técnicas terem sido desenvolvidas, as informações a respeito das comunidades microbianas eram coletadas diretamente do ecossistema ou dos microrganismos isolados (Atlas & Bartha, 1998).

A partir da década de 80, um grande número de métodos moleculares vem sendo desenvolvido para a análise da diversidade microbiana (Amann et al., 1995; Cullen & Hirsch, 1998) e estão tornando-se cada vez mais utilizados (Drozdowicz, 1997). As metodologias atuais utilizam o DNA total extraído diretamente dos microrganismos presentes no ambiente e ampliações via Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). O estudo do DNA genômico obtido a partir de uma amostra ambiental recebeu o nome de metagenoma (Borneman et al., 1996; Rondon et al., 2000).

A clonagem e o sequenciamento do gene do DNA/RNA ribossomal (rDNA/rRNA) tornaram possível a identificação dos microrganismos ainda desconhecidos e não cultivados (Borneman et al., 1996; Macrae, 2000; Kent & Triplett, 2002). Além disso, essas

metodologias podem ser aplicadas para identificar genes a serem utilizados em processos biotecnológicos e caracterizar genes de bactérias do solo e/ou da água (Sebat et al., 2003) responsáveis por processos biológicos como mineralização e decomposição da matéria orgânica.

Nos estudos metagenômicos os genes utilizados para análise da diversidade são os rRNA. Os RNAs que compõem os ribossomos (rRNAs) estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente de todos os sistemas de vida (Atlas, 1994). Três tipos de rRNA são comuns em ribossomos de procariotos e eucariotos: o 16S (exclusivo de procarioto), 18S (exclusivo de eucarioto) e 23S RNAs. Baseado na diferença entre os tamanhos, eles foram denominados como subunidade menor (SSU) para os rRNAs 16S e 18S, e subunidade maior (LSU) para o 23S rRNAs (Hurst et al., 2002).

O gene *16S rRNA* é composto por um conjunto de aproximadamente 1550 nucleotídeos (Woese et al., 1983) com regiões que se alternam entre áreas conservadas e variáveis, as quais permitem a investigação de amplo espectro na determinação das relações filogenéticas (Ludwig & Schleifer, 1994). O gene *16S rRNA* está presente em todos os organismos, com a mesma função em todos eles, alto grau de conservação e elevado número de cópias. O desenvolvimento da PCR e de técnicas de sequenciamento tem consolidado o papel dos genes ribossomais na filogenia. Atualmente, milhares de seqüências do gene *16S rRNA* estão disponíveis em banco de dados. Nos últimos anos, técnicas baseadas na análise de genes do 16S rRNA em procariotos (Muyzer et al., 1993) têm sido amplamente utilizadas na detecção, identificação, classificação e filogenia de microrganismos. A amplificação direta por PCR do 16S rDNA de amostras ambientais tem possibilitado o estudo da diversidade microbiana sem o cultivo dos microrganismos (Giovannoni et al., 1990), o que tem sido considerada a grande vantagem deste método (Hill et al., 2000). Dessa forma, a utilização do gene *16S rRNA* revolucionou o campo da ecologia microbiana possibilitando investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas (Kuske et al., 1997; Hentschel et al., 2002). Portanto, por meio dos estudos metagenômicos é possível identificar e descrever as comunidades bacterianas existentes no ambiente aquático e em outros ambientes.

Considerando que os estudos de limnologia aplicados à aquicultura ainda são insuficientes para a completa compreensão do funcionamento das *wetlands* construídas,

principalmente devido à diversidade de fatores que influenciam esses sistemas, a aplicação dos métodos moleculares podem identificar e favorecer a compreensão das funções das bactérias em ambientes naturais e/ou artificiais como viveiros de cultivos e *wetlands* construídas. O capítulo IV foi elaborado com o objetivo de identificar as comunidades bacterianas de uma *wetland* construída e povoada com *E. crassipes* (Figura 8A) para o tratamento do efluente de um viveiro de manutenção de reprodutores do camarão *M. rosenbergii* (Figura 8B).

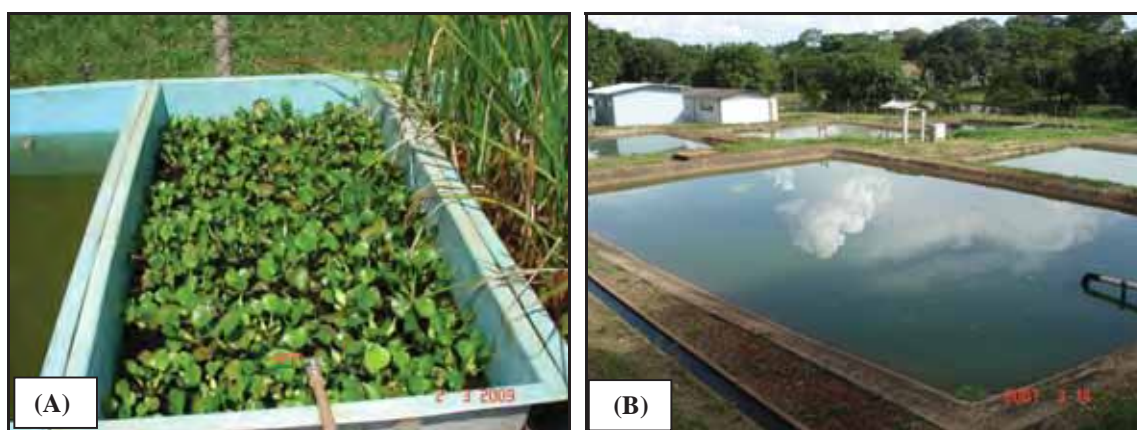


Figura 8. (A) *Wetland* construída e colonizada com *Eichhornia crassipes* (2 m³); (B) viveiro de 212,3 m³ (193 m² de superfície e 1,1 m de profundidade) do Setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura da UNESP. Viveiro utilizado para a manutenção de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann R.I., Ludwig W. & Sclifer K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of microbial individual cells without cultivation. *Microbiology Review*, 59, 143-169.
- Asaduzzaman M., Wahab M.A., Verdegem M.C.J., Mondal M.N. & Azim M.E. 2009. Effects of stocking density of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and addition of different levels of tilapia *Oreochromis niloticus* on production in C/N controlled periphyton based system. *Aquaculture*, Amsterdam, 286, 72-79.

- Atlas R.M. 1994. Hand Book of Microbiological Media. CRC Press, London, pp: 175.
- Atlas M. & Bartha R. 1998. Microbial ecology: Historical development . In: Atlas M., Bartha R. *Microbial Ecology*. New York, Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, p. 2-26.
- Azim M.E. & Wahab M.A. 2005. Periphyton –based pond polyculture. In: Azim M.E., Verdegem M.C.J., van Dam A.A. & Beveridge M.C.M. (Eds.) *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing, UK, pp. 207 – 222.
- Biudes J.F.V., Pezzato L.E. & Camargo A.F.M. 2009. Digestibilidade aparente da farinha do aguapé (*Eichhornia crassipes*) pela tilápia-do-nilo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 38, 2079-2085.
- Biudes J.F.V., Camargo A.F.M., Henares M.N.P. 2011. Impact of maintenance of *Macrobrachium rosenbergii* De Man 1879 (Crustacea, decapoda, Palaemonidae) broodstock on water used in culture ponds. *Brazilian Journal of Biology*, 71, 857-863.
- Blumenshine S.C., Vadeboncoeur Y., Lodge D.M., Cottingham K.L. & Knight S.E. 1997. Benthic–pelagic links: responses of benthos to water-column nutrient enrichment. *Journal of the North American Benthological Society*, 16, 466–479.
- Boaventura R., Pedro A.M., Coimbra J. & Lencastre E. 1997. Trout farm effluents: characterization and impacts on the receiving streams. *Environmental Pollution*, Barking, 95, 379-387.
- Borneman J., Skroch P.W., O’Sullivan K.M., Palus J.A., Rumjanek N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J. & Triplett, E.W. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 62, 935-943.
- Boyd C.E. & Tucker C.S. 1998. *Pond Aquaculture Water Quality Management*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers.
- Boyd C.E. 2003. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. *Aquaculture*, Amsterdam, 226, 101-112.

- Boyd C.E. & Queiroz J.F. 2004 Manejo das condições do sedimento do fundo e da qualidade da água e dos efluentes de viveiros. Pp. 25-43. In: Cyrino J.E.P., Urbinati E.C., Fracalossi D.M. & Castagnolli, N. (orgs.). *Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva*. TecArt, São Paulo, 533 p.
- Boyd C.E. & Zimmermann S. 2010. Grow-out system – water quality and soil management. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D'Abramo L.R. & Kutty M.N.), pp. 239-255. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Burford M.A., Glibert P.M. 1999. Short-term nitrogen uptake and regeneration in early and late growth phase shrimp ponds. *Aquaculture Research*, Oxford, 30, 215-227.
- Calheiros C.S.C., Duque A.F., Moura A., Henriques I.S., Correia A., Rangel A.O.S.S. & Castro P.M.L. 2009. Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. *Ecological Engineering*, Oxford, 35, 744-753.
- Calijuri M.C.; Alves M.S.A. & Santos A.C.A. 2006. Cianobacterias e cianotoxinas em águas continentais. Rima, São Carlos, 118p.
- Chua T.E., Paw J.N. & Guarian F.Y. 1989. The environmental impact of aquaculture and the effects of pollution on coastal aquaculture development in southeast Asia. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, 20, 335-343.
- Chen J.C. & Kou C.T. 1996. Nitrogenous excretion in *Macrobrachium rosenbergii* at different pH levels. *Aquaculture*, Amsterdam, 144, 155-164.
- Chung A.K.C., Wu Y., Tam N.F.Y. & Wong M.H. 2008. Nitrogen and phosphate mass balance in a sub-surface flow constructed wetland for treating municipal wastewater, *Ecological Engineering*, Oxford, 32, 81-89.
- Cohen J., Samocha T.M., Fox J.M., Gandy R.L. & Lawrence A.L. 2005. Characterization of water quality factors during intensive raceways production of juvenile *L. vannamei* using limited discharge and biosecure management tools. *Aquaculture Engineering*, Essex, 32, 425-442.

- CONAMA. Resolução N° 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília DF, 18 Marc 2005. Seção Resoluções, p. 19.
- Cooper P.F. & Findlater B.C. 1990. Constructed wetlands in water pollution control, International Association on Water Pollution Research and Control, Pergamon Press, Oxford.
- Cullen D.W. & Hirsch P.R. 1998. Simple and rapid method for direct extration of microbial DNA from soil for PCR. *Soil Biology and Biochesmistry*, Elmsford, 30, 983-993.
- Drozdowicz A. 1997. Bactérias de solo. In: Vargas M.A.T., Hungra M. *Biologia dos solos dos cerrados*. Embrapa / CPAC, p. 17-66.
- Ebeling J.M., Timmons M.B. & Bisogni J.J. 2006. Engineering analysis of the stoichiometry of photoatotropic, autotrophic and heterotrophic removal of ammonia-nitrogen in aquaculture system. *Aquaculture*, Amsterdam, 257, 346-358.
- Esteves F.A. & Panosso R. 2011. Fósforo. In: *Fundamentos de limnologia*. (Esteves F.A. - coordenador) 3ª. ed. Rio de Janeiro, Interciência, 826p.
- FAO. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2010. FIGIS – Fisheries Statistics – Aquaculture. Disponível em: //www.fao.org. (Acesso em 04/03/2011).
- Fink P. & Von Elert E. 2006. Physiological responses to stoichiometric constraints: nutrient limitation and compen- satory feeding in a freshwater snail. *Oikos*, Buenos Aires, 115, 484–494.
- Furlong M.A., Singleton D.R., Coleman D.C. & Whitman W.B. 2002. Molecular and cultured-based analyses of prokaryotic communities from an agricultural soil and burrows and casts of the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 68, 1265-1279.
- Ghosh A., Maity B., Chakrabarti K. & Chattopadhey D. 2007. Bacterial diversity of East Calcutta wetland area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnologies uses. *Microbial Ecology*, Amsterdam, 54, 452-459.

- Giovannoni S.J., Britschgi T.B., Moyer C.L. & Field K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345, 60-63.
- Hadad H.R., Maine M.A. & Bonetto C.A. 2006. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*, Oxford, 63, 1744-1753.
- Henares M.N.P. 2008. Utilização de macrófitas aquáticas flutuantes no tratamento de efluentes de carcinicultura. Jaboticabal, Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 93f.
- Henares M.N.P., Camargo A.F.M., Biudes J.F.V., Valenti W.C. 2011. Impacto da manutenção de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii* na qualidade da água. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 37, 183-190.
- Henry-Silva G.G. & Camargo A.F.M. 2006. Efficiency of aquatic macrophyte to treat Nile tilapia pond effluents. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 63, 433-438.
- Henry-Silva G.G., Camargo A.F.M. & Pezzato L.E. 2006. Digestibilidade aparente de macrófitas aquáticas pela tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) e qualidade da água em relação às concentrações de nutrientes, *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 35, 641-647.
- Henry-Silva G.G. & Camargo, A.F.M. 2008 Tratamento de efluentes de carcinicultura por macrófitas aquáticas flutuantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 37, 181-188.
- Hentschel U., Hopke J., Horn M., Friedrich A.B., Wagner M., Hacker J. & Moore B.S. 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 68, 4431-4440.
- Hill G.T., Mitkowski N.A., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T. & Nelson E.B. 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, 15, 25-36.

- Hurst C.J., Crawford R.L., Knudsen G.R., Mcinerney M.J. & Stetzenbach L.D. 2002. Manual of Environmental Microbiology. 2nd ed. Washington, DC, ASM Press. 1138 pp.
- Inoue L.A.K.A., Senhorini J.A. & Filho E.Z. 2003. Growth of Pacu juveniles in nightly aerated system. *Acta Scientiarum Animal Science*, Maringá, 25, 45–48.
- Jackson C., Preston N., Thompson P. J. & Burford M. 2003. Nitrogen budget and effluent nitrogen components at an intensive shrimp farm. *Aquaculture*, Amsterdam, 218, 397-411.
- Kadlec R.H. & Knigh R.L. 1996. Treatment wetlands, Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 893 p.
- Karplus I., Malecha S. & Sagi A. 2000. The biology and management of size variation. In: New M.B. & Valenti W.C. (Eds.) Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Oxford. Blackwell Science. P. 259-289.
- Kent A.D. & Triplett E.W. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, 56, 211-236.
- Keppeler E.C. & Valenti W.C. (2006) Effect of selective harvest of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum* on pond water, sediment and effluent. *Acta Limnologica Brasiliensia*, São Carlos, 18, 110-119.
- Keshavanath P., Gangadhar B., Ramesh T.J., Van Dam A.A., Beveridge M.C.M. & Verdegem M.C.J. 2004. Effects of bamboo substrate and supplemental feeding on growth and production of hybrid red tilapia fingerlings (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, Amsterdam, 235, 303–314.
- Konnerup D., Trang N.T.D., Brix H. 2011. Treatment of fish pond water by recirculating horizontal and vertical flow constructed wetlands in the tropics, *Aquaculture*, Amsterdam, doi:10.1016/j.aquaculture.2010.12.026
- Kuske C.R., Barns S.M. & Busch J.D. 1997. Diverse uncultured bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 63, 3614-3621.

- Kuris A.M.; Ra'Anan Z.; Sagi A. & Cohen D. 1987. Morphotyp differentiation of male Malaysian giant prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Crustacean Biology*, Woods Hole, 7, 219-237.
- Lin Y.F., Jing S.R., Lee D.Y. & Wang T.W. 2002. Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. *Aquaculture*, Amsterdam, 209, 169-184.
- Lin Y.F., Jing S.R., Lee, D.Y., Chang Y.F., Chen Y.M. & Shih K.C. 2005. Performance of a constructed wetland treating intensive shrimp aquaculture wastewater under high hydraulic loading rate. *Environmental Polluted*, 134, 411-421.
- Loch D.D., West J.L. & Perlmutter D.G. 1996. The effects of trout farm effluent on the richness of benthic macroinvertebrates. *Aquaculture*, Amsterdam, 147, 37-55.
- Ludwig W. & Schleifer K.H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*. Amsterdam, 15, 155-173.
- Macrae A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 31, 77-82.
- Mckinnon A.D., Trott L.A., Alongi D.M. & Davidson A. 2002. Water column production and nutrient characteristics in mangroove creeks receiving shrimp farm effluent. *Aquaculture Research*, Oxford, 33, 55-73.
- Midlen A. & Redding T. 2000. Environmental management for aquaculture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 223 p.
- Mires D. 1995. Aquaculture and aquatic environment: mutual impact and preventive management. *The Israeli Journal of Aquaculture*, Bamidgeh. 47, 163-172.
- Moraes-Riodades P.M.C. & Valenti W.C. 2004. Morphotypes in male Amazon river prawns, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture*, Amsterdam, 236, 297-307.
- Moraes-Riodades P.M.C., Kimpara J.M. & Valenti W.C. 2006. Effects of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* culture intensification on ponds hydrology. *Acta limnologica brasiliensia*, São Carlos 18, 311-319.

- Moraes-Valenti P. & Valenti W.C. (2010) Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D'Abramo L.R. & Kutty M.N), pp. 485-501. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Moriarty D.J.W. 1997. The role of microorganism in aquaculture ponds. *Aquaculture*, Amsterdam, 151, 333-349.
- Muyzer G., De Waal E.C. & Uitterlindem A. C. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reactin amplified genes for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 59, 695-700.
- Naylor S., Brisson J., Labelle M.A., Drizo A. & Comeau Y. 2003. Treatment of freshwater fish farm effluent using constructed wetlands: the role of plants and substrate. *Water Science and Technology*, London, 48, 215 – 222.
- Nogales B., Moore E.R.B., Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R. & Timmis K.N. 2001. Combined use of 16S Robosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 67, 1874 – 1884.
- Ono E.A. & Kubitzka F. 2003. Cultivo de peixes em tanques-rede. USP/ESALQ, Jundiaí. 112p.
- Páez-Osuna F., Guerrero-Galván S.R., Ruiz-Fernández A.C. & Espinoza-Ângulo R. 1997. Fluxes and mass balances of nutrients in a semi-intensive shrimp farm in North-West México. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, 34, 290-297.
- Páez-Osuna F. 2001 The environmental impact of shrimp aquaculture: causes, effects and mitigating alternatives. *Environmental Management*, New York, 28, 131-140.
- Pawar N.A., Jena, P.C. & Das Bhatnagar, D.D. 2009. Influence of duration of aeration on growth and survival of carp fingerlings during high density seed rearing. *Aquaculture*, Amsterdam, 290, 263-268.
- Pereira R.M., Silveira E.L., Scaquitto D.C., Pedrinho E.A.N., Val-moraes S.P., Wickert E., Carareto-Alves L.M. & Lemos E.G.M. 2006. Molecular characterization of bacterial

- populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 37, 439-447.
- Petrucio M.M. & Esteves F.A. 2000. Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, 60, 229-236.
- Pinto F.R., Henares M.N.P., Cruz C. & Amaral L.A. 2009. Remoção de *Escherichia coli* de efluentes de carcinicultura por macrófitas aquáticas flutuantes. *ARS Veterinária*, Jaboticabal, 25, 147-150.
- Pistori R.E.T., Henry-Silva G.G., Biudes J.F.V., Camargo A.F.M. 2010. Influence of aquaculture effluents on the growth of *Salvinia molesta*. *Acta Limnologica Brasiliensis*, São Carlos, 22, 179-186.
- Ra'Anan Z. & Cohen D. 1985. Ontogeny of social structure and population dynamics in the giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). 277-311. In Wenner A.M. (ed.) Factors in adult growth. A. A. Balkema, Boston, 362 p.
- Redding T., Todd S. & Midlen A. 1997. The treatment of aquaculture wastewater: a botanical approach. *Journal of Environmental Management*, London, 50, 283-289.
- Rogers G.L. & Fast A.W. 1988. Potencial benefits of low energy water circulation in Hawaiian prawn ponds. *Aquaculture Engineering*, Essex, 7, 155 – 165.
- Rondon M.R. August P.R. Bettermann A.D. Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A. Macneil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J. & Goodman R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy from accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 66, 2541-2547.
- Samocha T.M. & Lawrence A.L. 1997. Shrimp farms' effluent waters, environmental impact and potential treatment methods. In: Keller B.J. (Ed.), Interactions Between Cultured Species and Naturally Occurring Species in the Environment. pp. 35-38.

- Schulz C., Gelbrecht J. & Rennert B. 2003. Treatment of rainbow trout farm effluents in constructed wetland with emergent plants and subsurface horizontal water flow. *Aquaculture*, Amsterdam, 217, 207-221.
- Schwartz M.F. & Boyd C.E. 1995. Constructed wetlands for treatment of channel catfish pond effluents. *Progressive fish culturist*, Bethesda, 57, 255-267.
- Sebat J.L., Colwell F.S., Crawford R.L. 2003. Metagenomic Profiling: Microarray analysis of an environmental genomic library. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 69, 4927-4934.
- Shishehchian F., Yusoff F.M., Omar H. & Kamarudin M.S. 1999. Nitrogenous excretion of *Penaeus monodon* postlarvae fed with different diets. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, 39, 224-227.
- Silveira E.L., Pereira R.M., Scaquitto D.C., Pedrinho E.A.N., Val-moraes S.P., Wickert E., Carareto-Alves L.M. & Lemos E.G.M. 2006. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, 41, 1507-1516.
- Sindilariu P., Schulz D.C., Reiter R. 2007. Treatment of flow-through trout aquaculture effluents in a constructed wetland. *Aquaculture*, Amsterdam, 270, 92-104.
- Solano M.L., Soriano P. & Chiria M.P. 2004. Constructed wetlands as sustainable solution for wastewater treatment in small village. *Biosystems Engineering*, London, 87, 109-118.
- Sooknah R.D. & Wilkie A.C. 2004. Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. *Ecological Engineering*, Oxford, 22, 27-42.
- Stickney R.R. 1979. Principles of warmwater aquaculture. New York: John Wiley & Sons, Inc., p. 156-158.
- Stottmeister U., Wiebner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kastner M., Bederski O., Müller R.A. & Moormann H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, New York, 22, 93-117.

- Tanner C.C. 1996. Plants for constructed wetland treatment systems – A comparison of the growth and nutrient uptake of eight emergent species. *Ecological Engineering*, Oxford, 7, 59-83.
- Teichert-Coddington D.R., Rouse D.B., Potts A. & Boyd C.E. 1999. Treatment of harvest discharge from intensive shrimp ponds by settling. *Aquaculture Engineering*, Essex, 19, 147-161.
- Thomforde H.W. & Boyd C.E. 1991. Effects of aeration on water quality and channel catfish production. *Bamidgeh*, Nir-David, 43, 3–26.
- Tidwell J.H., Coyle S.D., VanArnum A. & Weibel C. 2000. Production response to increasing amounts of artificial substrate. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 31, 452–457.
- Tidwell J.H., Coyle S.D., Vanarum A., Weibel C. & D’Abramo L. 2001. Use of artificial substrates to maximize production of freshwater prawns in temperate climates. *World Aquaculture Magazine*, 32, 40-42+60.
- Tidwell J.H. & Coyle S. 2008. Impact of substrate physical characteristics on grow out of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, in ponds and pond microcosm tanks. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 39, 406 – 413.
- Tidwell J.H. & D’Abramo L.R. (2010) Grow-out systems – culture in temperate zones. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D’Abramo L.R. & Kutty M.N.), pp. 180-194. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Trott L.A. & Alongi D.M. 2000. The impact of shrimp pond effluent on water quality and phytoplankton biomass in a tropical mangrove estuary. *Marine Pollution Bulletin*, Oxford, 40, 947-951.
- Tundisi J.G. 2003. *Água do Século 21: Enfrentando a escassez*. Rima, São Carlos, 250 p.
- Tundisi J.G. & Tundisi T.M. 2008. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de textos. 631p.
- Uddin M. S., Azim M.E., Wahab M.A. & Verdegem M.C.J. 2009. Effects of substrate addition and supplemental feeding on plankton composition and production in tilapia

- (*Oreochromis niloticus*) and freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) polyculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 297, 99-105.
- USEPA - U.S. Environmental Protection Agency, 2000. Manual for Constructed Wetlands Treatment of Municipal Wastewaters. EPA/625/R-99/010, Cincinnati, OH, 166pp.
- Vacca G., Wand H., Nikolausz M., Kusch P. & Kästner M. 2005. Effect of plants and filter material on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. *Water Research*, New York, 39, 1361-1373.
- Valenti W.C. & Tidwell J.H. 2006. Economics and management of freshwater prawn culture in western hemisphere. Pp. 263 - 278. In: Leung P.S. & Engle C. (eds.). *Shrimp Culture: Economics, Market, and Trade*. Blackwell Science, Oxford. 443 p.
- Verhoeven J.T.A. & Meuleman A.F.M. 1999. Wetlands for wastewater treatment: Opportunities and limitations. *Ecological Engineering*, Oxford, 12, 5-12.
- Vymazal J. 1998. Types of constructed wetlands for wastewater treatment. In: Proceedings – 6th International Conference on Wetland System for Water Pollution Control. Águas de São Pedro – SP, Brazil, pp.150-166.
- Wahab M.A., Azim M.E., Ali M.H., Beveridge M.C.M. & Khan S. 1999. The potential of periphyton-based culture of the native major carp calbaush, *Labeo calbasu* (Hamilton). *Aquaculture Research*, Oxford, 30, 409-419.
- Zachritz W.H., Hanson A.T., Saucedo J.A. & Fitzsimmons K.M. 2008. Evaluation of submerged surface flow (SSF) constructed wetlands for recirculating tilapia production system. *Aquaculture Engineering*, Essex, 39, 16-23.
- Wetzel R.G. 2001. *Limnology: lake and river ecosystems*. 3th. ed. San Diego: Academic Press.
- Woese C.R., Gutell R., Gupta R. & Noller H.F. 1983. *Microbiology Reviews*, Amsterdam, 47, 621-669.

Capítulo II

**ALTERAÇÕES DAS CARACTERÍSTICAS LIMNOLÓGICAS DO CULTIVO DE
Macrobrachium amazonicum (HELLER, 1862) COM USO DE SUBSTRATO
ARTIFICIAL E AERAÇÃO NOTURNA**

**LIMNOLOGICAL CHARACTERISTICS CHANGES OF *Macrobrachium amazonicum*
(HELLER, 1862) REARING WITH ARTIFICIAL SUBSTRATE AND NIGHT
AERATION**

RESUMO

As alterações das características limnológicas do cultivo de *Macrobrachium amazonicum* com uso de substrato artificial e aeração noturna foram avaliadas em 12 viveiros (0,01 ha) de fundo natural povoados com 45 camarões m⁻². O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos e 3 repetições. Os tratamentos foram: cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (SSCA); cultivo com substrato artificial sem aeração noturna (CSSA); sem substrato e sem aeração noturna (SSSA); com substrato artificial com aeração noturna (CSCA). Nos viveiros dos cultivos CSSA e CSCA foram instaladas tela de nylon e nos viveiros dos cultivos SSCA e CSCA os aeradores foram acionados das 02h00 às 05h00. Mensalmente (janeiro a maio de 2009) foram determinados os valores de oxigênio dissolvido (OD), clorofila-*a*, turbidez, sólidos totais em suspensão (STS), nitrogênio Kjeldhal total (NKT) e fósforo total (PT). Os dados foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey ($P \leq 0,05$). No final do experimento, a concentração de OD nos cultivos CSSA e SSSA foi em média 24,3% (5,9 mg L⁻¹) menor em relação à concentração nos SSCA e CSCA (7,8 mg L⁻¹). Os valores de clorofila-*a*, turbidez e STS foram maiores nos cultivos com aeração noturna. A concentração de NKT foi em média 20% maior nos cultivos SSCA e CSCA (1,2 mg L⁻¹). Para PT, no final do experimento a concentração foi em média 2,9 vezes maior nos cultivos SSCA e CSSA (25,5 µg L⁻¹) do que nos SSSA e CSCA (8,7 µg L⁻¹). As alterações das características limnológicas foram mais intensas nos tratamentos com substrato artificial e aeração noturna, pois nesses cultivos os valores de clorofila-*a*, turbidez, STS, N e P foram mais elevados.

Palavras chave: limnologia, nitrogênio, fósforo, crustacea, carcinicultura

ABSTRACT

The changes of limnological characteristics of *Macrobrachium amazonicum* shrimp-farm with artificial substrate and night aeration were evaluated in 12 grow-out ponds (0.01 ha) with 45 shrimps m^{-2} . The completely randomized design was used with four treatments and three replications. The treatments were: rearing system without artificial substrate with night aeration (SSCA); system with artificial substrate without night aeration (CSSA); without artificial substrate without night aeration (SSSA) and rearing system with artificial substrate and night aeration (CSCA). In the CSSA and CSCA rearing ponds were installed nylon screen and in the SSCA and CSCA ponds rearing, the aerators were operated from 02h00 to 05h00. Monthly (from January to may 2009) were determined the dissolved oxygen (DO), chlorophyll-*a*, turbidity, total solids in suspension (TSS), total nitrogen Kjeldahl (TNK) and total phosphorus (TP). The datas were submitted to ANOVA followed by Tukey Test ($P \leq 0.05$). In the end of experiment time, the DO concentration in the CSSA and SSSA was in average 24.3% (5.9 mg L^{-1}) lower than SSCA and CSCA (7.8 mg L^{-1}) concentration. The chlorophyll-*a*, turbidity and TSS values were higher in the night aeration rearing. TNK concentration was higher 20% (1.2 mg L^{-1}) in the SSCA and CSCA systems. To TP, in the end of experiment the concentration was 2.9 times higher in the SSCA and CSCA ($25.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) than SASA and CSCA systems ($8.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). The changes of limnological characteristics were higher in with artificial substrate and night aeration treatments because in these rearing systems the chlorophyll-*a*, turbidity, TSS, N and P values were higher.

Key-words: limnology, nitrogen, phosphorus, crustacean, shrimp-farm

1. INTRODUÇÃO

A intensificação do sistema de cultivo de organismos aquáticos consiste na busca pela maior produtividade na mesma unidade de área. Esse processo envolve elevadas densidades de estocagem e maior aporte de energia externa sob a forma de fertilizantes, alimento e aeração (Moraes-Riodades et al., 2006). Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para intensificar a produção de camarões de água doce (Tidwell et al., 2004).

O gradeamento de juvenis, a despesca-seletiva e o uso de substrato artificial são utilizadas no cultivo de *Macrobrachium rosenbergii* para reduzir a variabilidade do tamanho e aumentar a produtividade (Tidwell & D'Abramo, 2010; Moraes-Valenti & Valenti, 2010). Essas técnicas podem ser associadas ao uso de aerador para aumentar a disponibilidade de oxigênio no viveiro e reduzir a estratificação da coluna d'água (Valenti et al., 2010).

Diversos estudos demonstraram os benefícios do uso do aerador no crescimento e produtividade dos organismos aquáticos. Inoue et al. (2003) relataram que a produtividade do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) aumentou de 2000 kg ha⁻¹ em viveiros desprovidos de aeração para aproximadamente 5000 kg ha⁻¹ nos viveiros com aeração. O uso do aerador no cultivo de algumas espécies de carpa (*Catla catla*, *Labeo rohita*, *L. fimbriatus* e *Puntius sarana*) aumentou o peso médio individual dos peixes de 5,6 para 7,1 g e a sobrevivência de 28,9 para 81,8% (Pawar et al., 2009). Embora implique no incremento do consumo de energia, o uso do aerador permite aumentar a biomassa no viveiro e manter as concentrações de oxigênio dissolvido em níveis adequados ao crescimento dos animais. Além disso, reduz a taxa de renovação da água e, conseqüentemente, os impactos provocados pelo lançamento dos efluentes em ecossistemas aquáticos naturais (Valenti et al., 2010).

A utilização de substrato artificial consiste na ampliação da área útil do viveiro, o que possibilita aumentar a densidade de estocagem e reduzir a competição entre os animais (Tidwell et al., 2000). No cultivo de camarões, o uso de substrato reduz os efeitos do crescimento heterogêneo, evita os confrontos agonísticos e melhora o bem estar animal (Karplus & Sagi, 2010). Alguns autores também relataram que o uso de substrato artificial melhora a qualidade da água e reduz a conversão alimentar devido ao acúmulo de perifiton, que metaboliza compostos nitrogenados e serve de alimento aos camarões (Tidwell & Bratvold, 2005; Milstein, 2005). No cultivo de *M. rosenbergii* em viveiros com substrato artificial Tidwell & Coyle (2008) observaram redução (48%) da conversão alimentar que passou de 2,5 para 1,2 e aumento da produtividade de 1342 para 2404 kg ha⁻¹. O uso do substrato artificial no cultivo de *M. rosenbergii* reduziu a concentração de N-NH₃ de 0,059 para 0,038 mg L⁻¹ e de N-NO₂ de 0,075 para 0,044 mg L⁻¹ (Asaduzzaman et al., 2009).

Entre as espécies de camarões nativas da América do Sul com potencial para a aquicultura o camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) se destaca como a mais importante (Routledge et al., 2006), pois apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a Venezuela até a Argentina (Maciel & Valenti, 2009) e vem sendo largamente explorada pela pesca artesanal no Brasil (New, 2005).

Estudos foram realizados para avaliar o efeito dos substratos na produtividade, qualidade da água e o acúmulo de perifiton como fonte de suplementação alimentar no cultivo de *M. rosenbergii* em monocultivo e policultivo com *Oreochromis* sp. (Tidwell & Bratvold, 2005; Asaduzzaman et al., 2009; Uddin et al., 2009). Porém estudos sobre as alterações provocadas pelo uso do uso de aerador e substrato artificial nas características limnológicas da água do cultivo de *M. amazonicum* ainda não foram realizados. O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações das características limnológicas do cultivo de *M. amazonicum* com aeração noturna e uso de substrato artificial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante 122 dias (12 janeiro à 13 de maio de 2009) em 12 viveiros retangulares de fundo natural (0,01 ha e profundidade média de 1 m) e capacidade para 100 m³ localizados em Jaboticabal (SP/Brasil) (21° 15'22''S e 48°18'48''W). O solo dos viveiros é classificado como latossolo vermelho escuro com predominância de textura argilosa (58,1%). O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é mesotérmico de inverno seco e verão quente (Cwa), com precipitação média entre 1.100 e 1.700 mm anuais e temperaturas médias do mês mais quente de 22°C e do mês mais frio 18°C. A precipitação e as médias mensais dos valores de temperatura nos meses de realização do experimento são apresentadas na figura 1.

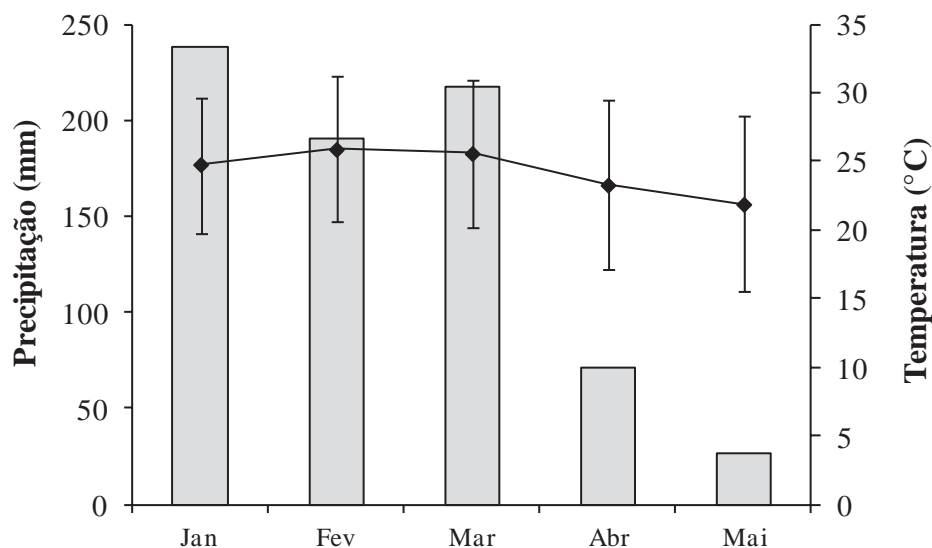


Figura 1. Precipitação (■) e média (média do valor máximo e mínimo) da temperatura do ar (◆) nos meses de cultivo do *Macrobrachium amazonicum*. **Fonte:** CIIAGRO Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas.

Antes do experimento os viveiros foram drenados, secos e o excesso de sedimento retirado manualmente. Posteriormente, receberam calagem com cal hidratada (1000 kg ha^{-1}) e foram abastecidos com água proveniente de duas represas dispostas em série que recebem efluentes dos Setores de Piscicultura e Ranicultura do Centro de Aquicultura da UNESP. Após o abastecimento os viveiros foram fertilizados com uréia e superfosfato simples na proporção de 8 kg N ha^{-1} e $16 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$, respectivamente. Durante todo o cultivo, o abastecimento dos viveiros foi realizado para repor as perdas de água por infiltração e evaporação, portanto não houve geração de efluente. A taxa de reposição da água nos viveiros foi de aproximadamente 12% do volume total de água do viveiro dia^{-1} .

Em todos os viveiros foram instalados aeradores e estes acionados entre 12h00 e 14h00 para reduzir a estratificação térmica da água. Para avaliar o efeito da aeração noturna nas características limnológicas da água dos viveiros de cultivo do *M. amazonicum* dois tratamentos receberam aeração entre 02h00 e 05h00. Dessa forma, foram testados sistemas de cultivo com substrato artificial e aeração noturna, conforme os seguintes tratamentos: sem substrato artificial com aeração noturna (SSCA); com substrato artificial sem aeração noturna (CSSA); sem substrato artificial sem aeração noturna (SSSA) e com substrato artificial com aeração noturna (CSCA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos, 3 repetições (viveiros) e 5 coletas realizadas com intervalo de aproximadamente 30 dias (21/01; 18/02; 18/03; 15/04 e 13/05).

Os viveiros foram povoados dia 12 de janeiro de 2009 com 45 juvenis (30 dias) de *M. amazonicum* m⁻² com peso médio individual de 0,024 ± 0,01 g. Embora densidades de estocagem superior a 40 indivíduos m⁻² reduzem o crescimento dos camarões (Moraes-Valenti et al., 2010), o uso de substrato permite aumentar a densidade sem comprometer o desenvolvimento dos animais (Tidwell et al., 2000). Nos cultivos CSSA e CSCA os viveiros foram providos de tela de nylon com abertura de malha de 30 mm, utilizadas em aquicultura para a proteção dos animais cultivados contra a predação por pássaros. Os substratos (telas) foram dispostos na vertical de modo que a área total dos substratos correspondesse a 50% da área do fundo do viveiro.

Durante o cultivo os camarões foram alimentados diariamente com dieta comercial peletizada (35% de proteína bruta) em duas porções iguais distribuídas às 08h00 e às 16h00 horas na taxa de 9 a 5% da biomassa contida em cada viveiro, conforme a fase de desenvolvimento. Na figura 2 são apresentadas as quantidades de dieta fornecida nos meses de cultivo. No mês de maio a quantidade de dieta fornecida foi menor devido à despesca total dos viveiros realizada no dia 12. A quantidade total fornecida durante o experimento foi de 53,3 kg no cultivo SSCA; 54,7 no CSSA; 56,5 no SSSA e 56,3 kg no cultivo CSCA.

A biomassa dos camarões foi estimada por meio de biometrias realizadas a cada 21 dias e a quantidade de dieta fornecida corrigida semanalmente, considerando 1% de mortalidade e 20% de ganho de peso por semana. As biometrias foram realizadas no dia 12 de fevereiro, 06 e 27 de março e 17 de abril. Nestes dias os camarões não foram alimentados.

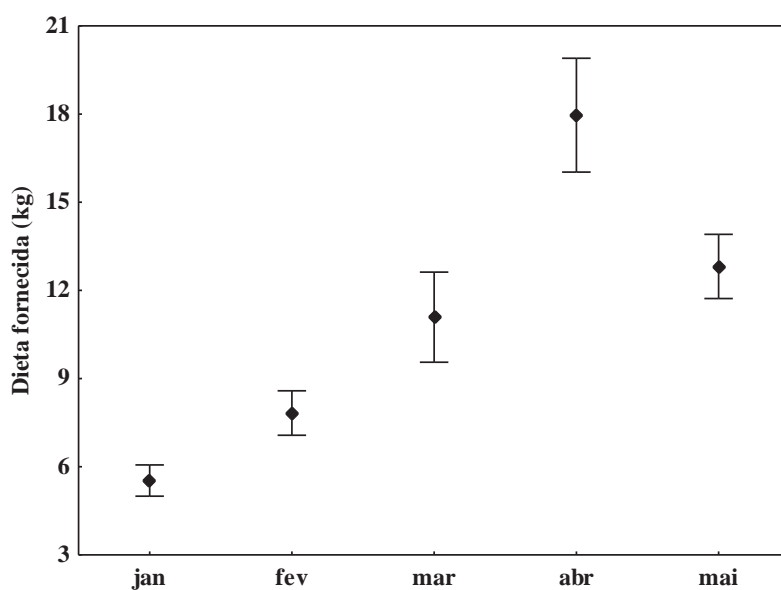


Figura 2. Médias e desvios padrão da quantidade total de dieta fornecida nos meses de cultivo.

A produção de camarões no sistema de cultivo SSCA foi $1131 \pm 10 \text{ kg ha}^{-1}$, no CSSA foi 1100 ± 150 , no SSSA 972 ± 20 e no CSCA $1158 \pm 70 \text{ kg ha}^{-1}$.

Nos cultivos com substrato (CSSA e CSCA), ao final do experimento, três amostras de $10 \times 10 \text{ cm}$ (100 cm^2) do substrato artificial foram retiradas para determinar a massa seca e o estoque de nitrogênio Kjeldahl total (NKT) e fósforo total (PT) no material aderido à tela. As áreas retiradas foram cuidadosamente raspadas com auxílio de uma lâmina e todo o material raspado foi colocado em placas de petri previamente pesadas em balança de precisão (Mettler Toledo modelo AB104-S) para a determinação da massa fresca. Após a pesagem, as placas de petri com as amostras foram acondicionadas em estufa a 60°C até atingir massa seca constante. A concentração de NKT no substrato foi determinada pelo método Semi-micro Kjeldahl descrita no APHA (2005, 4500–N C.) e a concentração de PT (P %MS) conforme a metodologia descrita por Allen et al. (1974).

O estoque de NKT e PT no material aderido ao substrato foi calculado conforme a seguinte equação:

$$E = M * C/100;$$

em que E = estoque (g de N ou P m^{-2}); M = massa seca do material aderido (g m^{-2}) e C = concentração de NKT e PT na massa seca do material aderido ao substrato (%MS).

As variáveis limnológicas dos diferentes sistemas de cultivo foram determinadas mensalmente, entre 06h00 e 08h00 horas em triplicata. Os métodos utilizados para determinar os valores das variáveis medidas *in situ* e das variáveis analisadas em laboratório são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Variáveis limnológicas e métodos de análises.

Variáveis limnológicas	Método de análise	Referências	Especificação do aparelho
Temperatura (°C)	Termômetro digital		Yellow Springs Instruments, (YSI) <i>incorporated</i> modelo 556 MPS
Cond. elétrica (mS cm ⁻²)	Condutivímetro digital		Yellow Springs Instruments, (YSI) <i>incorporated</i> modelo 556 MPS
pH	pHômetro digital		Yellow Springs Instruments, (YSI) <i>incorporated</i> modelo 556 MPS
OD (mg L ⁻¹)	Oxímetro digital		Yellow Springs Instruments, (YSI) <i>incorporated</i> modelo 556 MPS
Clorofila- <i>a</i> (mg L ⁻¹)		APHA 2005 (10200-H)	HACH DR/2500
Turbidez (FTU)	HACH, Loveland, CO, USA		HACH DR/2000
STS (mg L ⁻¹)	HACH, Loveland, CO, USA		HACH DR/2000
N-amoniaco (µg L ⁻¹)	Fenol, colorimétrico	APHA 2005 (4500-NH ₃ F)	HACH DR/2500
N-NO ₂ (µg L ⁻¹)	Colorimétrico	APHA 2005 (4500-NO ₂ B)	HACH DR/2500
N-NO ₃ (µg L ⁻¹)	Redução por cádmio	APHA 2005 (4500-NO ₃ E)	HACH DR/2500
NKT (mg L ⁻¹)	Semi-micro Kjeldahl	APHA 2005 (4500-N C)	Destilador Kjeldahl
P-ortofosfato (µg L ⁻¹)	Cloreto estanoso (colorimétrico)	APHA 2005 (4500-P B)	HACH DR/2000
PT (µg L ⁻¹)	Cloreto estanoso (colorimétrico)	APHA 2005 (4500-P D)	HACH DR/2000

OD = Oxigênio Dissolvido; STS = Sólidos Totais em Suspensão; N-NO₂ = N-nitrito; N-NO₃ = N-nitrato, NKT = Nitrogênio Kjeldahl Total; P-PO₄ = P-ortofosfato; PT = Fósforo total.

2.1 Análise Estatística

Os dados de oxigênio dissolvido, clorofila-*a*, turbidez, STS, NKT, P-PO₄ e PT dos sistemas de cultivos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Bartlett para verificar a normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Atendida as premissas, os dados foram submetidos à Análise de Variância de medidas repetidas (ANOVA – *repeated measures*). Quando encontrada diferenças significativas entre as médias, estas foram comparadas por meio do teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Os valores de oxigênio dissolvido, clorofila-*a*, turbidez, STS, NKT, P-PO₄ e PT foram submetidos à ANOVA, pois compreendem as principais variáveis limnológicas utilizadas na avaliação das alterações das características limnológicas de viveiros de cultivo de organismos aquáticos. Essas variáveis, especialmente fósforo, indicam o estado trófico dos ecossistemas aquáticos (Tundisi & Tundisi, 2008). Aos valores médios de oxigênio dissolvido, clorofila-*a*, turbidez, STS, N-amoniaco, N-NO₂, N-NO₃, NKT e PT foi aplicada Análise de Componentes Principais (ACP) (Bouroche & Saporta, 1982) com o objetivo de agrupar e verificar a diferença entre as coletas.

3. RESULTADOS

A média (\pm desvio padrão) da massa fresca total do material aderido ao substrato nos cultivos CSSA e CSCA foi de $34,3 \pm 11,2$ e $68,8 \pm 38,6$ kg, respectivamente. No CSSA a massa seca representou em média 15,2% da massa fresca, enquanto no CSCA a massa seca representou 12,7%. O estoque de NKT em ambos os cultivos foram semelhantes, porém o estoque de PT foi 1,6 vezes maior no cultivo CSCA (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão da massa seca total e do estoque de NKT e PT nos sistemas de cultivo com substrato artificial.

Sistemas de Cultivo	Massa seca (g m ⁻²)	Estoque (g m ⁻²)	
		NKT	PT
Substrato Artificial (CSSA)	5179 ± 1356	$3,52 \pm 1,01$	$0,14 \pm 0,03$
Substrato Artificial + Aeração Noturna (CSCA)	8707 ± 3523	$3,51 \pm 1,61$	$0,23 \pm 0,16$

As variáveis limnológicas (oxigênio dissolvido, clorofila-*a*, turbidez, STS, NKT, P-PO₄ e PT) submetidas à ANOVA de medidas repetidas apresentaram diferença significativa ($P \leq 0,01$ e $P \leq 0,001$) entre os sistemas de cultivo e as coletas (Tabela 3). Além disso, para essas variáveis a ANOVA mostrou interação (tratamento X coleta) significativa (Tabela 3).

Tabela 3. Valor de *F* e coeficiente de variação (CV) das variáveis limnológicas submetidas à Análise de Variância.

Parâmetros estatísticos	Variáveis Limnológicas						
	OD	Clor- <i>a</i>	Turb	STS	NKT	P-PO ₄	PT
Trat (T)	444,54***	22,84***	54,67***	76,78***	10,77**	8,97**	14,56***
Coletas (C)	626,32***	203,37***	230,00***	382,90***	231,71***	98,33***	248,96***
T x C	73,30***	16,09***	8,67***	17,67***	11,77***	12,38***	10,50***
CV (Trat)	3,02	23,62	7,47	9,48	14,89	33,37	13,57
CV (Coletas)	3,14	24,10	14,70	13,72	16,36	28,28	15,41

Trat = Tratamentos; OD = Oxigênio dissolvido; Clor-*a* = Clorofila-*a*; Turb = Turbidez; STS = Sólidos Totais em Suspensão; NKT = Nitrogênio Kjeldahl Total; P-PO₄ = P-ortofosfato; PT = Fósforo total. *Nível de significância (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

A temperatura média na água dos viveiros foi $26,0 \pm 0,1$ °C e os valores médios de pH variaram entre 7,0 e 7,5 no cultivo CSCA e SSCA, respectivamente. Quanto à condutividade elétrica, o valor médio nos diferentes cultivos foi de $0,08 \text{ mS cm}^{-2}$. As concentrações de oxigênio dissolvido permaneceram, na maioria das coletas, acima de $4,5 \text{ mg L}^{-1}$ em todos os cultivos. Porém, no final do experimento ocorreu redução da concentração de OD nos cultivos SSSA e CSSA, que apresentaram valores $43,6\%$ ($4,0 \pm 0,7 \text{ mg L}^{-1}$) menor em relação a concentração média dos cultivos com aeração noturna (SSCA e CSCA) ($7,1 \pm 0,8 \text{ mg L}^{-1}$) (Figura 3).

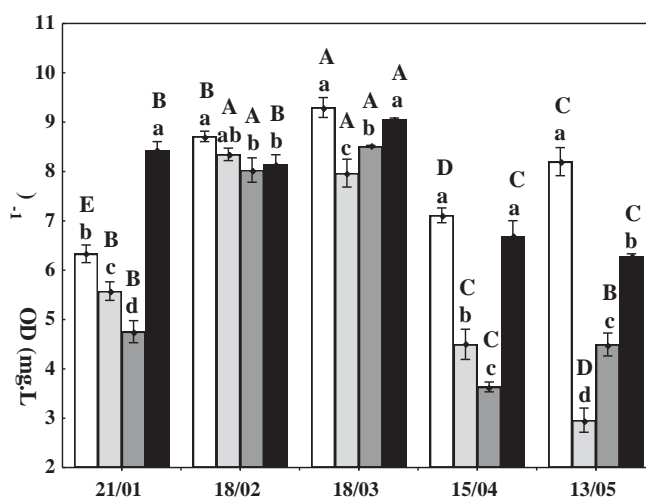


Figura 3. Valores médios ($n=15$) e desvios padrão da concentração de oxigênio dissolvido (OD) do sistema de cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (□), com substrato artificial sem aeração noturna (▒), sem substrato sem aeração noturna (■) e com substrato com aeração noturna (■). Letra minúscula corresponde à comparação dos tratamentos na mesma coleta e letra maiúscula corresponde à comparação do tratamento nas diferentes coletas (Teste de Tukey – $P \leq 0,05$).

Os valores de turbidez e as concentrações de clorofila-*a*, STS, NKT, P-PO₄ e PT não apresentaram grandes variações até 18/03. Após esta coleta houve aumento dos valores dessas variáveis em todos os sistemas de cultivo, com destaque para os valores mais elevados de turbidez e NKT nos cultivos com aeração noturna (SSCA e CSCA). Nesses cultivos a turbidez, no final do experimento, foi em média 3,8 vezes maior em relação à inicial. Para NKT, no final do experimento, o aumento foi de 2,8 vezes no cultivo SSCA e 4,0 vezes no CSCA. No cultivo SSCA as concentrações de clorofila-*a*, STS e P-PO₄ aumentaram em média 8,5; 3,8 e 18,4 vezes, respectivamente (Figura 4). Os valores mais elevados de PT ocorreram nos cultivos SSCA e CSSA, que aumentaram em média 4,8 vezes mais em relação ao valor inicial (Figura 4).

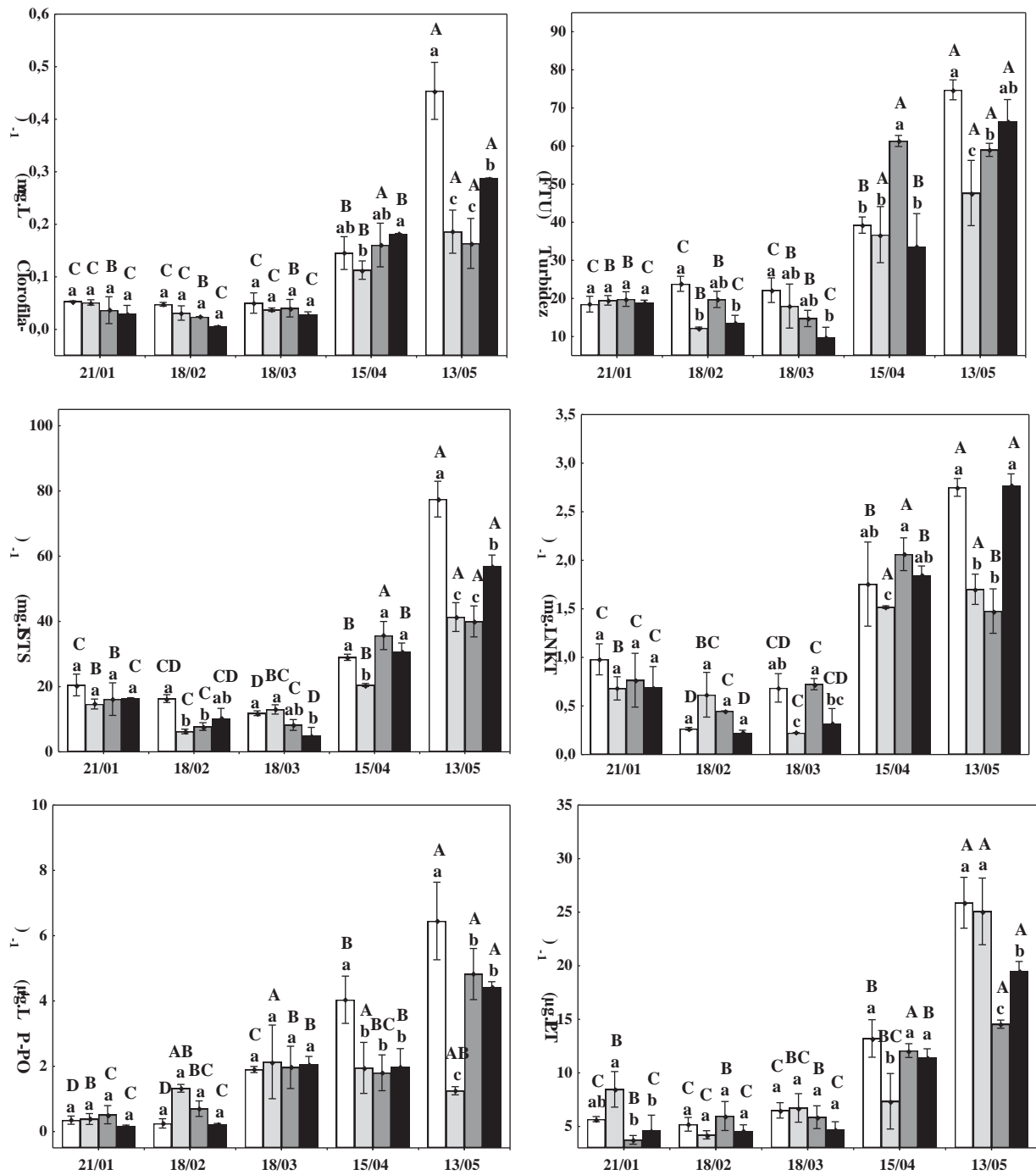


Figura 4. Valores médios ($n=15$) e desvios padrão da concentração de clorofila-a, turbidez, sólidos totais em suspensão (STS), nitrogênio Kjeldahl total (NKT), ortofosfato ($P-PO_4$) e fósforo total (PT) do sistema de cultivo sem substrato artificial com aeração noturna (\square), com substrato artificial sem aeração noturna (\blacksquare), sem substrato artificial sem aeração noturna (\blacksquare) e com substrato artificial com aeração noturna (\blacksquare). Letra minúscula corresponde à comparação dos tratamentos na mesma coleta e letra maiúscula corresponde à comparação do tratamento nas diferentes coletas (Teste de Tukey – $P \leq 0,05$).

A Análise de Componentes Principais (ACP) resumiu 81,73% da variabilidade total dos dados em seus dois primeiros componentes. O primeiro componente (CP1) explicou 71,39% do total da variância encontrada, enquanto o segundo componente (CP2) explicou 10,34%. As variáveis, clorofila-*a*, turbidez, STS, N-amoniacal, N-NO₂, NKT e PT apresentaram-se negativamente correlacionadas com CP1, enquanto N-NO₃ apresentou-se correlacionada positivamente. Oxigênio dissolvido apresentou-se negativamente correlacionado com CP2. Todas as variáveis apresentaram correlacionadas a algum dos dois componentes com valor do coeficiente acima de 0,6 (Tabela 4). CP1 mostra dois grupos de variáveis negativamente correlacionadas entre si: grupo 1 (G1) compreende as variáveis que correspondem ao aumento de partículas (seston) na água dos viveiros (clorofila-*a*, turbidez e STS); grupo 2 (G2) as variáveis que correspondem ao aumento da concentração de nutrientes dissolvidos (N-amoniacal, N-NO₂, NKT e PT), exceto N-NO₃ (Tabela 4).

Tabela 4. Coeficientes de correlação entre as variáveis limnológicas e os dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais em diferentes sistemas de cultivo de *Macrobrachium amazonicum*.

Variáveis Limnológicas	Componente Principal	
	CP1	CP2
Oxigênio dissolvido	0,474169	-0,785855
Clorofila- <i>a</i>	-0,944714	-0,093008
Turbidez	-0,947194	0,138730
Sólidos Totais em Suspensão	-0,941032	0,049335
N-NO ₃	0,637012	0,107483
N-amoniacal	-0,726737	-0,492034
N-NO ₂	-0,914699	0,149469
NKT	-0,953585	0,036499
PT	-0,919166	0,07117
Varição explicada (%)	71,39	10,34
Interpretação	Acúmulo e decomposição da matéria orgânica	

As últimas coletas (15/04 e 13/05) encontram-se à esquerda do gráfico da ACP (Figura 5) apresentando valores mais elevados das variáveis negativamente correlacionadas com CP1 (clorofila-*a*, turbidez, STS, N-amoniacal, N-NO₂, NKT e PT) e valor menor da variável (N-NO₃) positivamente correlacionada com o mesmo componente. A primeira coleta (21/01)

(agrupamento A), segunda (18/02) (agrupamento B) e terceira coleta (18/03) (agrupamento C) encontram-se à direita do gráfico, ou seja, possuem valores menores de clorofila-*a*, turbidez, STS, N-NO₂, NKT e PT e valores mais elevados de N-NO₃. Essas coletas (agrupamento D) diferem das últimas, pois apresentam características opostas (Figura 5). A proximidade dos pontos de coleta no agrupamento (D) indica que no início do experimento as características limnológicas da água dos viveiros foram semelhantes, independente dos sistemas de cultivo. As coletas 15/04 e 13/05, que se referem aos números 4 e 5, encontram-se dispersas no gráfico indicando que no decorrer do experimento as características limnológicas da água dos viveiros tornam-se distintas, com destaque para os valores mais elevados das variáveis correlacionadas negativamente com CP1 e CP2 nos cultivos SSCA e CSCA, que estão localizados à esquerda na parte inferior do gráfico (Figura 5).

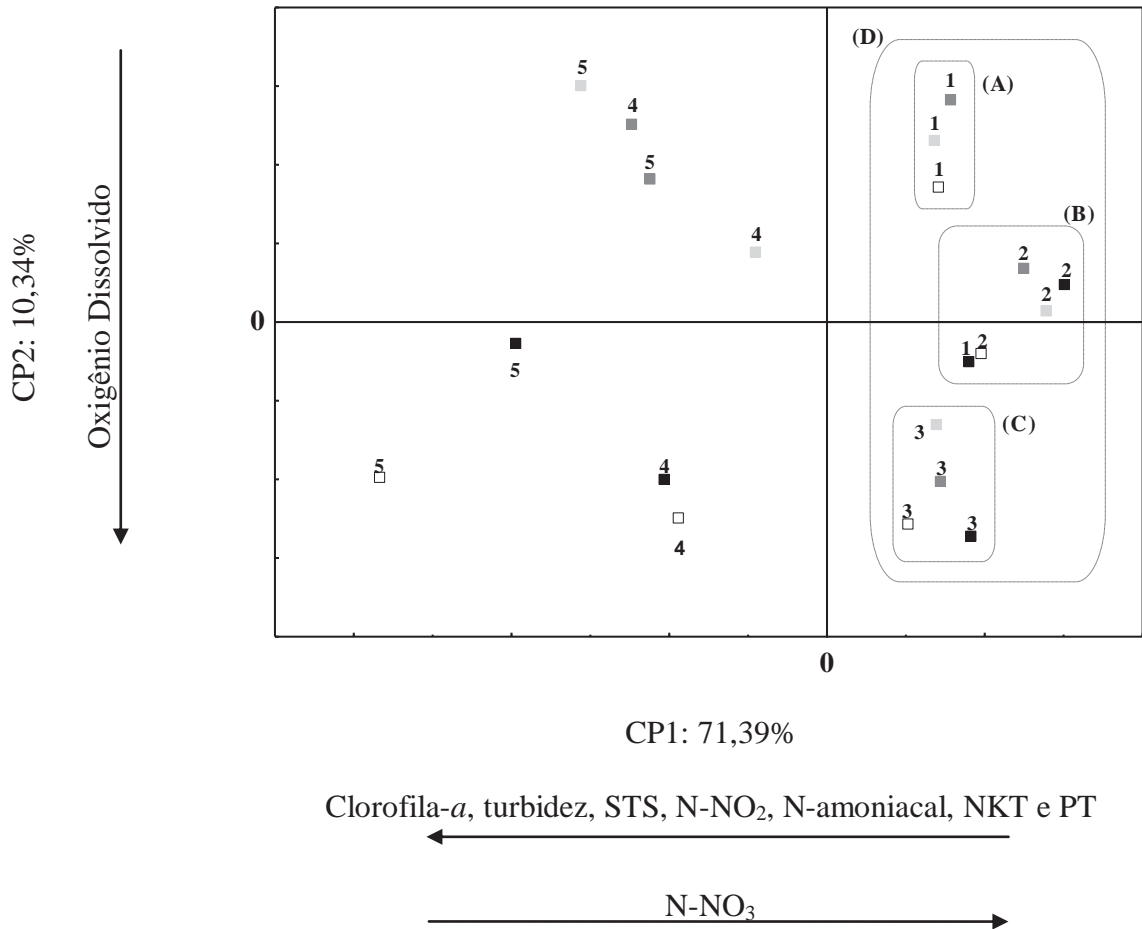


Figura 5. Análise de Componentes Principais das variáveis limnológicas do cultivo de *Macrobrachium amazonicum* sem substrato artificial com aeração noturna (□); com substrato artificial sem aeração noturna (■); sem substrato artificial sem aeração noturna (■); com substrato artificial com aeração noturna (■). A, B, C e D = formação de 4 grupos; 1 - 5 = coletas. Os dois componentes resumiram 81,73% da variabilidade total dos dados (CP1 = 71,39% e CP2 = 10,34%).

4. DISCUSSÃO

A Análise de Variância e Análise de Componentes Principais mostraram que os cultivos SSCA, CSSA, SSSA e CSCA apresentaram características limnológicas semelhantes no início do experimento. Isto ocorre porque a biomassa estocada e a quantidade de dieta fornecida, no início, são semelhantes. No entanto, no decorrer do cultivo o incremento gradual da biomassa dos camarões e da quantidade de alimento fornecido provoca redução da concentração de oxigênio dissolvido e aumento dos valores de turbidez, STS, N e P. O aumento das concentrações de nitrogênio inorgânico, NKT e PT possuem uma relação linear positiva com o incremento da biomassa de reprodutores de *M. rosenbergii* (Biudes et al., 2011). A relação entre

o aumento da concentração de nitrogênio e fósforo e o incremento da biomassa dos animais cultivados também foi observado no cultivo do *M. amazonicum* SSCA, CSSA, SSSA e CSCA. De fato, na ACP a combinação dos grupos de variáveis G1 (clorofila-*a*, turbidez e STS) e G2 (N-amoniacoal, N-NO₂, NKT e PT) sugere que no decorrer do cultivo ocorre aumento da concentração de nutrientes e detritos devido ao baixo aproveitamento do N e P presentes na dieta fornecida e ao acúmulo de matéria orgânica no sedimento dos viveiros.

O uso do substrato artificial em viveiros de aquicultura favorece a formação e o desenvolvimento da comunidade perifítica (Keshavanatah et al., 2002; Khatoon et al., 2007). A biomassa de perifíton aumenta gradualmente no decorrer do cultivo, provavelmente, devido ao incremento de N e P provenientes do processo de decomposição da matéria orgânica acumulada, da lixiviação da dieta fornecida e não consumida e da excreção dos animais cultivados. Relação positiva entre o aumento da disponibilidade de nutrientes na coluna d'água e o incremento da biomassa de perifíton, em substratos instalados em viveiros de aquicultura, foi observada por Azim et al. (2003). Esses autores relataram aumento médio da matéria seca de 2 mg cm⁻², na primeira semana, para 5,1 mg cm⁻² na sexta semana de experimento. O incremento da biomassa de perifíton se deve à absorção das formas inorgânicas de N (N-amoniacoal, N-NO₂ e N-NO₃) e P (P-ortofosfato) da água de cultivo (Hari et al., 2004; Asaduzzaman et al., 2009). Esses nutrientes são limitantes do crescimento e da produtividade primária do perifíton e fitoplâncton (Burford, 1997). A absorção de N e P pelo perifíton reduz a concentração desses nutrientes na água dos viveiros de aquicultura (Bratvold & Browdy, 2001; Khatoon et al., 2007). Entretanto, neste estudo não foi possível observar esta relação, provavelmente devido à quantidade de alimento fornecido durante o experimento. O fornecimento de alimento proporcional à biomassa estocada favoreceu o acúmulo de matéria orgânica nos viveiros e, conseqüentemente, intensificou os processos de decomposição e lixiviação. Durante esses processos ocorre aumento das concentrações de N e P devido à liberação de formas solúveis (N-NO₂, N-NO₃, N-amoniacoal, aminoácidos, P-PO₄, fosfoproteínas e fosfolípídeos) (Mires, 1995). No cultivo de *M. rosenbergii* (15 g m⁻²) com uso de substrato artificial, a redução da quantidade de dieta fornecida de 10 para 3% da biomassa estocada resultou na redução de 41,3% de N-NO₃ (de 0,075 para 0,044 mg L⁻¹) e 32,1% de P-PO₄ (de 1,87 para 1,27 mg L⁻¹) na água do cultivo (Asaduzzaman et al., 2009). Portanto, em cultivos com uso de substratos é possível reduzir a quantidade de alimento fornecido, pois parte do N e P liberados nos processos de decomposição e lixiviação é absorvida pelo perifíton, que serve de alimento aos camarões (Tidwell et al., 2001; Azim & Wahab, 2005).

O estoque de NKT no perifiton foi semelhante nos cultivos CSSA e CSCA devido à absorção das formas inorgânicas de N. Já o estoque de PT no perifiton foi maior no cultivo CSCA, provavelmente, devido à sedimentação no substrato dos detritos suspensos durante aeração. A adsorção do fósforo aos detritos, argilas, compostos orgânicos e carbonatos é apontada como uma das principais formas de mobilização e imobilização dos íons fosfatos em ecossistemas aquáticos rasos, principalmente, daqueles com condições oxidantes e pH próximo ao neutro (Esteves & Panosso, 2011). Nessas condições o PO_4^{3-} é adsorvido a oxí-hidróxidos de ferro formando agregados altamente insolúveis (p. ex. FeOOHPO_4) (Wetzel, 2001; Kalff, 2002).

A redução da concentração de oxigênio dissolvido nos sistemas de cultivo CSSA e SSSA está relacionada à ausência da aeração noturna, à respiração dos animais e, principalmente, à decomposição da matéria orgânica. Redução da concentração de oxigênio dissolvido decorrente da decomposição da matéria orgânica (dieta não consumida, fezes e restos de animais mortos) e da respiração dos camarões também foi relatada por Henry-Silva et al. (2010) em viveiros de manutenção de reprodutores de *M. amazonicum* e por Henares et al. (2011) em viveiros de manutenção de reprodutores de *M. rosenbergii*. Durante todo o experimento, o fornecimento médio de 55,6 kg de dieta nos cultivos CSSA e SSSA, resultou na produção média de 1036 kg de camarão ha^{-1} . Porém, ocasionou a redução de 52,4% na concentração de oxigênio dissolvido (de 8,2 para 3,9 mg L^{-1}) e aumento médio de 2,6 vezes na concentração de STS, que passou de 15,4 mg L^{-1} no início do cultivo para 40,7 mg L^{-1} no final. Nos cultivos com aeração noturna (SSCA e CSCA) a concentração de oxigênio dissolvido permaneceu acima de 6,0 mg L^{-1} , mas a concentração de STS, no final do cultivo, foi em média 6,5 vezes maior no SSCA (77,5 mg L^{-1}) e 3,5 vezes no CSCA (56,8 mg L^{-1}).

O impacto dos cultivos CSSA e CSCA na concentração de oxigênio dissolvido foi semelhante ao observado por Baccarin e Camargo (2005) no cultivo de *Oreochromis niloticus* submetidos à diferentes dietas alimentares (farelada, peletizada, extrusada e alimento natural). Esses autores relataram que o aumento da biomassa estocada ocasionou a redução de 54,5% na concentração de oxigênio dissolvido (de 5,5 para 2,5 mg L^{-1}). Quanto à concentração de sólidos em suspensão, o cultivo de *M. amazonicum* independente dos sistemas avaliados neste estudo (SSCA, CSSA, SSSA e CSCA) casou maior impacto, pois os valores de STS foram, em média, 4,6 vezes maiores em relação aos observados por Baccarin e Camargo (2005) (12,4 mg L^{-1}). O aumento da turbidez e STS ocorre naturalmente no decorrer do cultivo devido ao incremento dos detritos decorrentes do aumento da quantidade de dieta fornecida (Anh et al., 2010). A quantidade de dieta fornecida no cultivo realizado por Baccarin e Camargo (2005) (151,1 kg) foi

2,7 vezes maior em relação à quantidade fornecida nos cultivos SSCA, CSSA, SSSA e CSCA (55,2 kg), no entanto os valores de turbidez e STS foram mais elevados, provavelmente, devido ao acionamento do aerador que provoca ressuspensão dos detritos.

O acionamento do aerador entre 02h00 e 05h00 manteve a concentração de oxigênio dissolvido acima de $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ nos cultivos SSCA e CSCA, principalmente no final do experimento, quando a biomassa e a quantidade de matéria orgânica acumulada nos viveiros são maiores. Todavia, as concentrações de oxigênio dissolvido observadas no SSSA e CSSA, também, permaneceram dentro do intervalo adequado para o cultivo de *Macrobrachium* (entre 3 e 7 mg L^{-1}) (Boyd & Zimmermann, 2010). Portanto, no cultivo de *M. amazonicum* estocados na densidade de 45 camarões m^{-2} o uso do aerador durante o período noturno não é necessário, pois além do consumo de energia, provoca a liberação de nutrientes e a ressuspensão dos detritos para coluna d' água. A dieta fornecida associada ao uso do aerador tende a aumentar os valores de turbidez e sólidos suspensos na água dos viveiros (Ritvo et al., 1997). O aumento da disponibilidade de nutrientes favoreceu o crescimento do fitoplâncton, observado pelo aumento da concentração de clorofila-*a*. De fato, no final do experimento os valores de clorofila-*a*, turbidez e STS foram maiores nos cultivos SSCA e CSCA. Nos cultivos SSSA e CSSA também houve aumento da concentração de STS, mas nesses tratamentos o aumento dessa variável esteve relacionado à ressuspensão dos detritos em decorrência da movimentação dos camarões, principalmente dos indivíduos de maior tamanho, como observado por Kimpara et al. (2010) no cultivo de *M. amazonicum* submetidos à diferentes estratégias de despesca.

Os resultados deste trabalho mostram que o uso de substrato artificial e aeração noturna para o cultivo de *M. amazonicum* (45 camarões m^{-2}) ocasionam alterações mais intensas na água dos viveiros, pois nos sistemas de cultivo SSCA e CSCA foram observados valores mais elevados de clorofila-*a*, turbidez, STS, N e P. O uso de substratos favorece o desenvolvimento do perifíton e, provavelmente, possibilitam a ocupação da coluna d' água pelos camarões, porém o crescimento do perifíton não favoreceu a redução da concentração de N e P da água de cultivo. Este fato se deve à liberação dos nutrientes durante a decomposição da matéria orgânica acumulada nos viveiros e à lixiviação da dieta fornecida, que foi proporcional a biomassa estocada durante todo o cultivo. A aeração noturna, nas condições de cultivo avaliadas, não é necessária, pois nos cultivos CSSA e SSSA não foram observadas concentrações de oxigênio dissolvido que pudesse prejudicar o desenvolvimento dos camarões. Além disso, o uso do aerador aumenta os valores de turbidez e sólidos totais em suspensão e requer maior consumo de energia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen S.E., Grinshaw H.M., Parkinson J.A. & Quarmby C. 1974. Chemical Analysis of Ecological Materials. Blackwell, Oxford, 565 p.
- American Public Health Association (APHA) 2005. *Standart methods for the examination of water and wastewater*. 20th edn. APHA, Washington, DC, USA.
- Anh P.T., Kroeze C., Bush S.R. & Mol A.P.J. 2010. Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control. *Agricultural Water Management*, Amsterdam, 97, 872-882.
- Asaduzzaman M., Wahab M.A., Verdegem M.C.J., Benerjee S., Akter T., Hasan M.M. & Azim M.E. 2009. Effects of addition of tilapia *Oreochromis niloticus* and substrate for periphyton developments on pond ecology and production in C/N-controlled freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* farming systems. *Aquaculture*, Amsterdam, 287, 371 – 380.
- Azim M.E., Milstein A., Wahab M.A. & Verdegem M.C.J. 2003. Periphyton – water quality relationships in fertilized fishponds with artificial substrates. *Aquaculture*, Amsterdam, 228, 169-187.
- Azim M.E. & Wahab M.A. 2005. Periphyton –based pound polyculture. In: Azim M.E., Verdegem M.C.J., van Dam A.A. & Beveridge M.C.M. (Eds.) *Periphyton: Ecology, Exploitation and Management*. CABI Publishing, UK, pp. 207 – 222.
- Baccarin A.E. & Camargo A.F.M. 2005. Characterization and evaluation of the impact of feed management on the effluents of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture. *Archives of Biology and Technology*, Curitiba, 48, 81-90.
- Biudes J.F.V., Camargo A.F.M., Henares M.N.P. 2011. Impact of maintenance of *Macrobrachium rosenbergii* De Man 1879 (Crustacea, decapoda, Palaemonidae) broodstock on the water used in culture ponds. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, 71, 857-863.
- Boyd C.E. & Zimmermann S. 2010. Grow-out system – water quality and soil management. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed. by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D’Abramo L.R. & Kutty M.N.), pp. 239-255. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Bouroche J.M. & Saporta G. 1982. *Análise de dados*. Zahar, Rio de Janeiro. 116 p.
- Bratvold D. & Browdy C.I. 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* system. *Aquaculture*, Amsterdam, 195, 81-94.
- Burford M. 1997. Phytoplankton dynamics in shrimp ponds. *Aquaculture Research*, Amsterdam, v. 28, 351-360.

- Chung A.K.C., Wu Y., Tam N.F.Y. & Wong M.H. 2008. Nitrogen and phosphate mass balance in a sub-surface flow constructed wetland for treating municipal wastewater. *Ecological Engineering*, Oxford, 32, 81-89.
- Drizo A., Comeau Y., Forget C. & Chapuis R.P. 2002. Phosphorus saturation potencial – A parameter for estimating the longevity of constructed wetlands systems. *Environmental Science Technology*, Easton, 36, 4642-4648.
- Esteves F.A. & Panosso R. 2011. Fósforo. In: *Fundamentos de limnologia*. (Esteves F.A. - coordenador) 3ª. ed. Rio de Janeiro, Interciência, 826p.
- Hari B., Kurup M.B., Varghese J.T., Sharma J.W. & Verdegem M.C.J. 2004. Effects of carbohydrate addition on production in extensive shrimp culture system. *Aquaculture*, Amsterdam, 241, 179-194.
- Henares M.N.P., Camargo A.F.M., Biudes J.F.V., Valenti W.C. 2011. Impacto da manutenção de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii* na qualidade da água. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 37, 183-190.
- Henry-Silva G.G., Camargo A.F.M., Pontes C.S. & Miyase L.K. 2010. Características limnológicas da coluna d'água e dos efluentes de viveiros de criação de Camarões da Amazônia. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 39, 2099–2017.
- Inoue L.A.K.A. Senhorini, J.A. & Filho E.Z. 2003. Growth of Pacu juveniles in nightly aerated system. *Acta Scientiarum Animal Science*, Maringá, 25, 45–48.
- Kalff J. 2002. *Limnology: Inland water ecosystem*. Prentice Hall.
- Karplus I. & Sagi A. 2010. The biology and management of size variation. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed. by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D'Abramo L.R. & Kutty M.N.), pp. 316-345. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Keshavanath P., Gangadhar B., Ramesh T.J., van Dam A.A., Beveridge M.C.M & Verdegem M.C.J. 2002. The effect periphyton and supplemental feeding on the productin of the indigenous carps *Tor khudree* and *Labeo fimbriatus*. *Aquaculture*, Amsterdam, 213, 207-218.
- Khatoon H, Yusoff F, Baerjee M.S & Bujang S. 2007. Formation of periphyton biofilm and subsequent biofouling on different substrates in nutrient enriched brackiswater shrimp ponds. *Aquaculture*, Amsterdam, 273, 470-477.
- Kimpara J.M., Rosa F.R.T., Preto B.L. & Valenti W.C. 2010. Limnology of *Macrobrachium amazonicum* grow-out ponds subjected to high inflow of nutrient-rich water and different

- stocking and harvest management. *Aquaculture Research*, Oxford, 42: 1-9. doi:10.1111/j.1365-2109.2010.02717.x 1-9.
- Maciel C.R. & Valenti W.C. 2009. Biology, fisheries and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius*, Rio Grande, 17, 61-79.
- Milstein A. 2005. Effect of periphyton on water quality. In: Periphyton: Ecology, Exploitation and Management (ed. by Azim M.E., Verdegem M.C.J., van Dam A.A. & Beveridge M.C.M.). pp. 179-190. CABI Publishing, UK.
- Mires D. 1995. Aquaculture and the aquatic environment: mutual impact and preventive management. *Israeli Journal of Aquaculture*, 47, 163-172.
- Moraes-Riodades P.M.C., Kimpara J.M. & Valenti W.C. 2006. Effects of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* culture intensification on ponds hydrology. *Acta limnologica brasiliensia*, São Carlos, 18, 311-319.
- Moraes-Valenti P. & Valenti W.C. 2007. Effect of intensification on grow out of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Journal of World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 38, 516-526.
- Moraes-Valenti P.; Moraes P.A.; Preto B.L. & Valenti W.C. 2010. Effects of density on population development in the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquatic biology*, Amsterdam, 9, 291-301.
- Moraes-Valenti P. & Valenti W.C. 2010. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed. by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D'Abramo L.R. & Kutty M.N.), pp. 485-501. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- New M.B. 2005. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquaculture Research*, Oxford, 36, 210 - 230.
- Pawar N.A., Jena, P.C. & Das Bhatnagar, D.D. 2009. Influence of duration of aeration on growth and survival of carp fingerlings during high density seed rearing. *Aquaculture*, Amsterdam, 290, 263-268.
- Reddy K.R. & D'Angelo E.M. 1997. Biogeochemical indicators to evaluated pollutant removal efficiency in constructed wetlands. *Water Science and Technology*, London, 35, 1-10.
- Ritvo G., Neill W.H., Lawrence A.L. & Samocha T.M. 1997. Turbidity related to shrimp size in tanks with soil substrate. *Aquacultural Engineering*, Essex, 16, 221-225.

- Routledge E.A.B., Mathias J.F.N. & Freitas L.E.L. 2006. Aquaculture researches priorities in Brazil. In: *Abstracts of Aquaculture 2006*, 9 – 13 maio 2006, Firenze, p. 816. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge.
- Tidwell J.H., Coyle, S.D., VanArnum, A. & Weibel C. 2000. Production response to increasing amounts of artificial substrate. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 31, 452–457.
- Tidwell J.H., Coyle S.D., Vanarum A., Weibel C. & D’Abramo L. 2001. Use of artificial substrates to maximize production of freshwater prawns in temperate climates. *World Aquaculture Magazine*, 32, 40-42+60.
- Tidwell J.H., Coyle S.D. & Dasgupta S. 2004. Effects of stocking different fractions of size graded juvenile prawns on production and population structure during a temperature limited grow out period. *Aquaculture*, Amsterdam, 231, 123-134.
- Tidwell J.H. & Bratvold D. 2005. Utility of add substrates in shrimp culture. In: *Periphyton – ecology, exploitation, and management* (ed. by Azim M.E., Verdegem M.C.J., van Dam A.A. & Beveridge M.C.M.). pp. 247-268. CABI Publishing, UK.
- Tidwell J.H. & Coyle S. 2008. Impact of substrate physical characteristics on grow out of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, in ponds and pond microcosm tanks. *Journal of the World Aquaculture Society*, Baton Rouge, 39, 406 – 413.
- Tidwell J.H. & D’Abramo L.R. 2010. Grow-out systems – culture in temperate zones. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed. by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D’Abramo L.R. & Kutty M.N.), pp. 180-194. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Tundisi J.G. & Tundisi T.M. 2008. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de textos. 631p.
- Uddin M.S., Azim M.E., Wahab M.A. & Verdegem M.C.J. 2009. Effects of substrate addition and supplemental feeding on plankton composition and production in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) polyculture. *Aquaculture*, Amsterdam, 297, 99-105.
- Valenti W.C. 1998. Sistema de produção na fase de crescimento final. In: *Carcinicultura de água doce: tecnologia para produção de camarões* (ed. por Valenti W.C.) Brasília, pp.165-178.
- Valenti W.C., New M.B., Salin K.R. & Ye J. 2010. Grow-out systems – monoculture. In: *Freshwater Prawns: Biology and Farming* (ed. by New M.B., Valenti W.C., Tidwell J.H., D’Abramo L.R. & Kutty M.N.), pp. 154-179. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Wetzel R.G. 2001. *Limnology: lake and river ecosystems*. 3th. ed. San Diego: Academic Press.

Capítulo III

**EFICIÊNCIA DE DIFERENTES WETLANDS CONSTRUÍDAS PARA O
TRATAMENTO DO EFLUENTE DE REPRODUTORES DE *Macrobrachium
rosenbergii* (De Man, 1879)**

**EFFICIENCY OF DIFFERENT CONSTRUCTED WETLANDS TO EFFLUENT
TREATMENT OF *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) BROODSTOCK**

RESUMO

A eficiência de *wetlands* colonizadas com macrófita aquática flutuante *Eichhornia crassipes* e macrófita emersa *Typha domingensis* para o tratamento do efluente de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii* foi avaliada em 12 tanques dispostos em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos (*wetlands*) foram: sistema de tratamento com *E. crassipes* (Ec); sistema de tratamento por sedimentação (SE); sistema com *T. domingensis* (Td); sistema com solo filtrante (SF). Quinzenalmente (fevereiro a abril de 2008) foram calculadas as taxas de remoção da carga de material particulado em suspensão (MPS), N-amoniaco, N-nitrito (N-NO₂), Nitrato (N-NO₃), nitrogênio Kjeldahl total (NKT), P-ortofosfato (P-PO₄), fósforo dissolvido (PD) e fósforo total (PT). A taxa de remoção de MPS foi maior nos sistemas Td e SF com média de 58,7 g dia⁻¹ e Ec com 47,7 g dia⁻¹. A taxa de remoção da carga NKT nos sistemas Td e SF (0,69 g dia⁻¹) foi em média 2,3 e 1,3 vezes maior em comparação à taxa no SE (0,30 g dia⁻¹) e Ec (0,54 g dia⁻¹), respectivamente. As taxas de remoção das cargas de N-amoniaco e P-PO₄ foram maiores nos sistemas Ec e Td. As taxas de remoção da carga de N-NO₂, N-NO₃, PD e PT nos sistemas Ec, Td e SF não diferiram entre si. Os sistemas Td, SF e Ec são mais eficientes na remoção das cargas de MPS, N e P, porém o sistema com *E. crassipes* (Ec) apresentou mais facilidade de manejo e operação. Portanto, para o tratamento do efluente de viveiro de reprodutores de *M. rosenbergii* deve-se utilizar *wetlands* colonizadas com *E. crassipes*.

Palavras-chave: carcinicultura, camarão da malásia, qualidade de água, nitrogênio e fósforo

ABSTRACT

The efficiency of wetlands with the floating aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* and the emerged *Typha domingensis* in the treatment of effluent of broodstock shrimp *Macrobrachium rosenbergii* was evaluated in 12 tanks (2m²) in completely randomized design. The treatments (wetlands) were: treatment system with *E. crassipes* (Ec); treatment system by sedimentation (SE); treatment system with *T. domingensis* (Td); system with filter substrate (SF). The load removal rates of particulate suspended material (PSM), ammonia-N, N-nitrite (NO₂-N), N-nitrate (NO₃-N), total nitrogen Kjeldahl (TNK), P-orthophosphate (PO₄-P), dissolved phosphorus (DP) and total phosphorus (TP) was assessed every two week (from February to April of 2008). The removal PSM rate was higher in the Td and SF systems with average 58.7 g day⁻¹ and Ec with 47.7 g day⁻¹. The removal TNK rate load in the Td and SF systems (0.69 g day⁻¹) was on average 2.3 and 1.3 times higher than SE (0.30 g day⁻¹) and Ec (0.54 g day⁻¹) rates, respectively. The removal rates of ammonia-N and PO₄-P load were significantly higher in the Ec and Td systems. The removal rates of NO₂-N, NO₃-N, DP and TP on the Ec, Td and SF systems did not differ each other. The Td, SF and Ec systems are more efficient in removal of PSM, N and P load, however the Ec system was easier in handling and operation. Thus, to the effluent treatment of *M. rosenbergii* broodstock should use wetlands with *E. crassipes*.

Key-words: shrimp-farm, giant river prawn, water quality, nitrogen and phosphorus

1. INTRODUÇÃO

No cultivo de organismos aquáticos e na manutenção dos reprodutores é comum a renovação da água do viveiro para manter a qualidade da água em níveis adequados ao crescimento dos animais. O volume de água necessário para a produção de 1 tonelada de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), sem oxigenação artificial, foi estimado em 86.000 m³ (Brinker, 2005). Na produção de organismos aquáticos apenas 25 a 30% do nitrogênio e fósforo adicionados aos sistemas de cultivo é convertido em biomassa animal, o restante é perdido na coluna d'água, adsorvido às partículas do sedimento ou é lançado para fora do viveiro no efluente (Boyd et al., 2007). Dessa forma, a renovação diária da água do viveiro ocasiona o lançamento constante de nitrogênio e fósforo nos ecossistemas aquáticos.

A taxa de renovação da água em viveiros de *catfish* (*Pangasianodon hypophthalmus*) varia entre 30 e 100% ao dia dependendo do estágio do cultivo, e pode ocasionar um aumento no corpo d'água receptor do efluente de 47,3 kg de nitrogênio/tonelada de peixe produzido (Phan et al., 2009). Embora nos viveiros de manutenção de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii* a taxa de renovação diária seja menor (10 a 15% do volume do viveiro) (Biudes et al., 2011; Henares et al., 2011), o lançamento contínuo do efluente pode ocasionar a eutrofização artificial dos ecossistemas aquáticos naturais com alterações das comunidades. Findlay et al. (2009) observaram aumento anual de 400% da biomassa de fitoplâncton e *bloom* de crisofíceas e dinoflagelados em regiões de lagos próximas à fazenda do cultivo de truta, no Canadá. Canary et al. (2009) atribuíram a redução da diversidade da macrofauna bentônica (*Nephtys fluviatilis*, *Heleobia australis*) em região estuarina ao lançamento do efluente do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Em represa impactada pelo lançamento de efluentes de aquicultura, Pistori et al. (2010) relataram aumento de 12,5 vezes na biomassa (37,4 g de matéria seca m⁻²) de *Salvinia molesta* em comparação a uma represa não impactada (3,0 g de matéria seca m⁻²).

Os sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas, *wetlands* construídas (WC's), têm sido utilizados com eficiência (Sindilariu et al., 2007) há mais de 20 anos para o tratamento de diversos tipos de efluentes, incluindo os domésticos, agrícolas, industriais e de aquicultura (Zachritz et al., 2008). Quando utilizados na aquicultura, *wetlands* construídas possibilitam a redução da carga de matéria orgânica, material particulado e nutrientes, o que reduz os impactos ambientais ocasionados pelo lançamento contínuo do efluente (Konnerup et al., 2011). Além disso, apresentam baixo custo de manutenção, operação e fácil manejo (Zimmels et al., 2009; Kumar & Zhao, 2011).

A redução da carga de material particulado e nutrientes ocorre devido à absorção do nitrogênio e fósforo pelas macrófitas aquáticas (Kadlec & Knight, 1996; Babatunde & Zhao, 2009) e à interação de processos químicos, biológicos e físicos (Lin et al., 2005; Ebeling et al., 2006; Babatunde et al., 2010). Entretanto, a eficiência desses sistemas pode apresentar grande variação em função das condições climáticas locais, da carga de poluentes no efluente, do tempo de residência do efluente no sistema (Shutes, 2001) e, principalmente, das espécies e dos grupos ecológicos das macrófitas utilizadas. O tratamento do efluente do cultivo de *Oreochromis niloticus* com macrófitas aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta* possibilitou a redução da turbidez em 90,6; 89,3 e 83,8%, respectivamente (Henry-Silva & Camargo, 2006). A utilização da macrófita aquática emersa *Spartina alterniflora* para o tratamento do efluente de pós-larvas do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* reduziu a concentração de N-NO₂ em 75%, de N-NO₃ entre 35 e 55% e de P-ortofosfato entre 59 a 64% (Sousa et al., 2011).

Diversos estudos foram realizados para comparar a eficiência de *wetlands* com macrófitas aquáticas de diferentes espécies, mas pertencentes ao mesmo grupo ecológico. Entretanto, estudos comparando a eficiência de macrófitas de diferentes grupos ecológicos são escassos. Redding et al. (1997) testaram a eficiência de macrófita aquática emersa, flutuante e submersa para o tratamento do efluente de cultivo de tilápia-do-nilo (*O. niloticus*) e concluíram que *wetland* colonizada com *Rorippa nasturtium-aquaticum* (emersa) foi mais eficiente na remoção de nitrogênio e fósforo do que *wetlands* colonizadas com *Azolla filiculoides* (flutuante) e *Elodea nuttalli* (submersa). O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de *wetlands* construídas com macrófita aquática flutuante *Eichhornia crassipes* e macrófita aquática emersa *Typha domingensis* no tratamento do efluente de um viveiro de manutenção de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii* mantidos na densidade média de 100 g m⁻².

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante 12 semanas (fevereiro à abril de 2008) em Jaboticabal (SP/Brasil) (21° 15'22"S e 48°18'48"W). O efluente foi proveniente de um viveiro de fundo natural, 193 m² e profundidade média de 1,1 m (212,3 m³). O solo do viveiro é classificado como latossolo vermelho escuro com predominância de textura argilosa (58,1%). O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é mesotérmico de inverno seco e verão quente (Cwa), com precipitação média entre 1.100 e 1.700 mm anuais e temperaturas médias do mês mais quente de 22°C e do mês mais frio 18°C. A precipitação e

as médias mensais dos valores de temperatura nos meses de realização do experimento são apresentadas na figura 1.

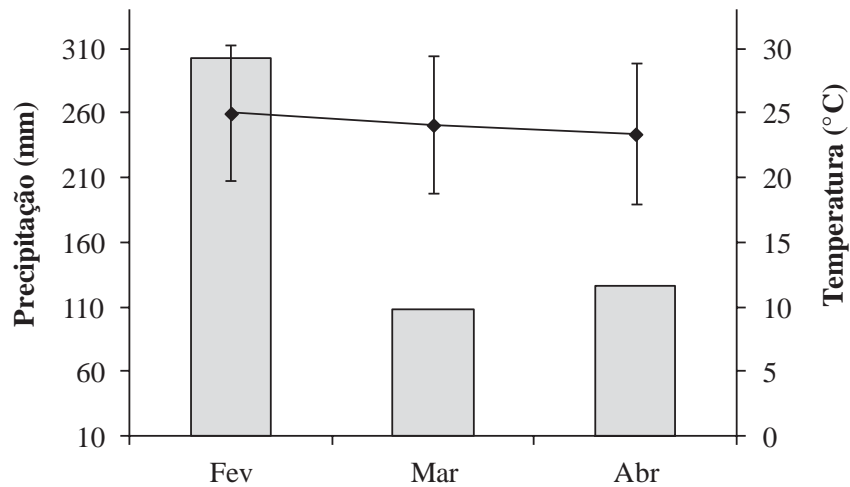


Figura 1. Precipitação (■) e média (média do valor máximo e mínimo) da temperatura do ar (◆) nos meses de realização do experimento. **Fonte:** CIIAGRO Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas.

Duas represas localizadas a montante foram utilizadas para o abastecimento de água do viveiro. A vazão da água na entrada do viveiro foi de aproximadamente $34,9 \pm 0,3 \text{ L min}^{-1}$. Nessa vazão a taxa de renovação diária foi de aproximadamente 24% do volume total da água do viveiro. Os camarões reprodutores da espécie *Macrobrachium rosenbergii* com peso médio de $40 \text{ g indivíduo}^{-1}$ foram mantidos na densidade média de 100 g m^{-2} e alimentados, diariamente às 16h00 com dieta comercial peletizada composta por 37% de proteína bruta (mínimo). A quantidade fornecida foi equivalente a 4% da biomassa total dos reprodutores no viveiro.

Para avaliar a eficiência das *wetlands* foram testados os seguintes tratamentos: sistema de tratamento com a macrófita aquática flutuante *E. crassipes* (Ec); sistema de tratamento sem macrófita aquática (SE = sedimentação); sistema de tratamento com a macrófita aquática emersa *T. domingensis* (Td); sistema de tratamento com solo filtrante (SF) formado por camadas de pedras e areia (ver descrição adiante). Os tratamentos foram dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado. O tratamento SE foi utilizado como controle do tratamento Ec e o tratamento SF como controle do tratamento Td. As 12 unidades experimentais (4 tratamento – *wetlands* x 3 repetições) foram constituídas cada uma por 1 tanque de fibra de vidro com 1,0 m de largura, 2,0 m de comprimento e 1,0 m de profundidade (Figura 2).

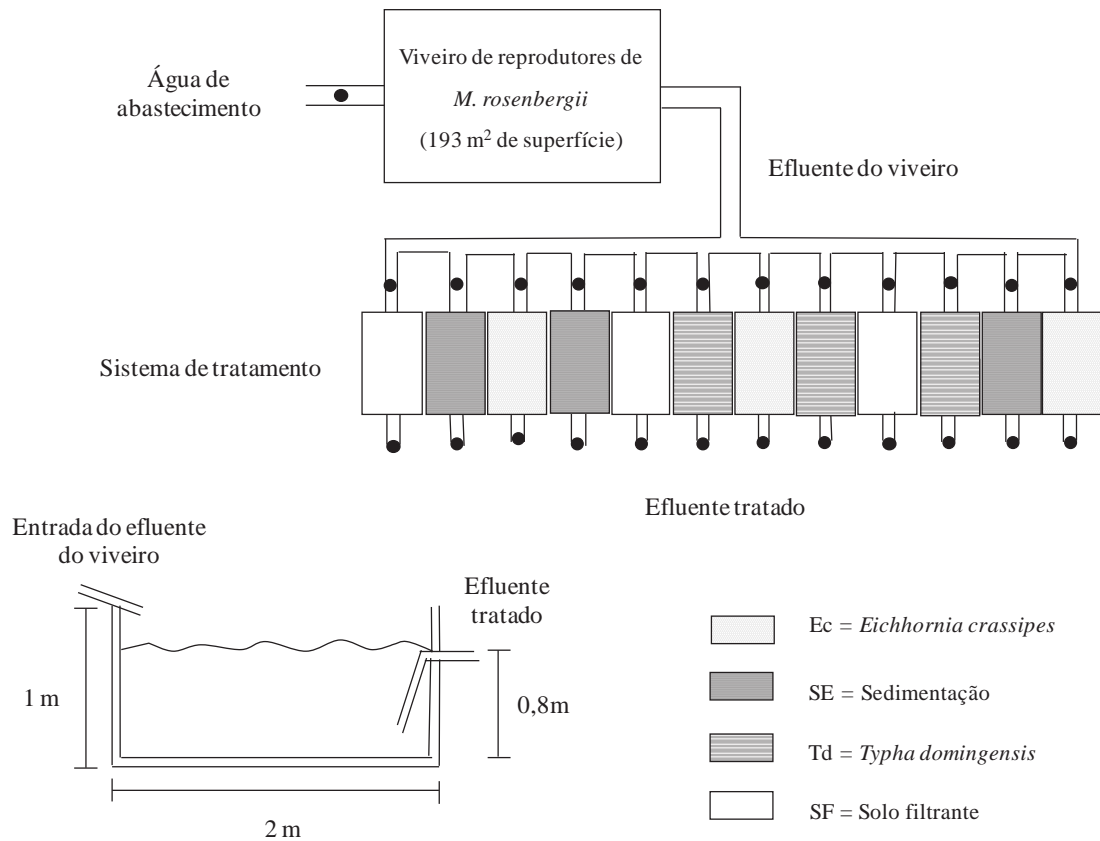


Figura 2. Desenho esquemático das *wetlands* construídas para o tratamento do efluente do viveiro de manutenção dos reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii*. (●) indica pontos de coleta.

Nos tanques dos sistemas sem substrato (Ec e SE) o nível do efluente permaneceu aos 0,8 m. Os tanques dos sistemas com substrato (Td e SF) foram constituídos por uma camada superior de 0,2 m de solo; uma camada de areia grossa (0,2 m); uma de pedra brita (0,2 m) e no fundo uma camada de cascalho (0,2 m), totalizando 0,8 m de substrato (Figura 3). Os 12 tanques foram dispostos ao ar livre e o tempo de residência do efluente nos tanques foi de aproximadamente 12 horas, com vazão de 2,2 L min⁻¹ ajustada e controlada por registro hidráulico instalado na entrada de cada tanque. O efluente do viveiro foi conduzido por gravidade até os sistemas de tratamentos.

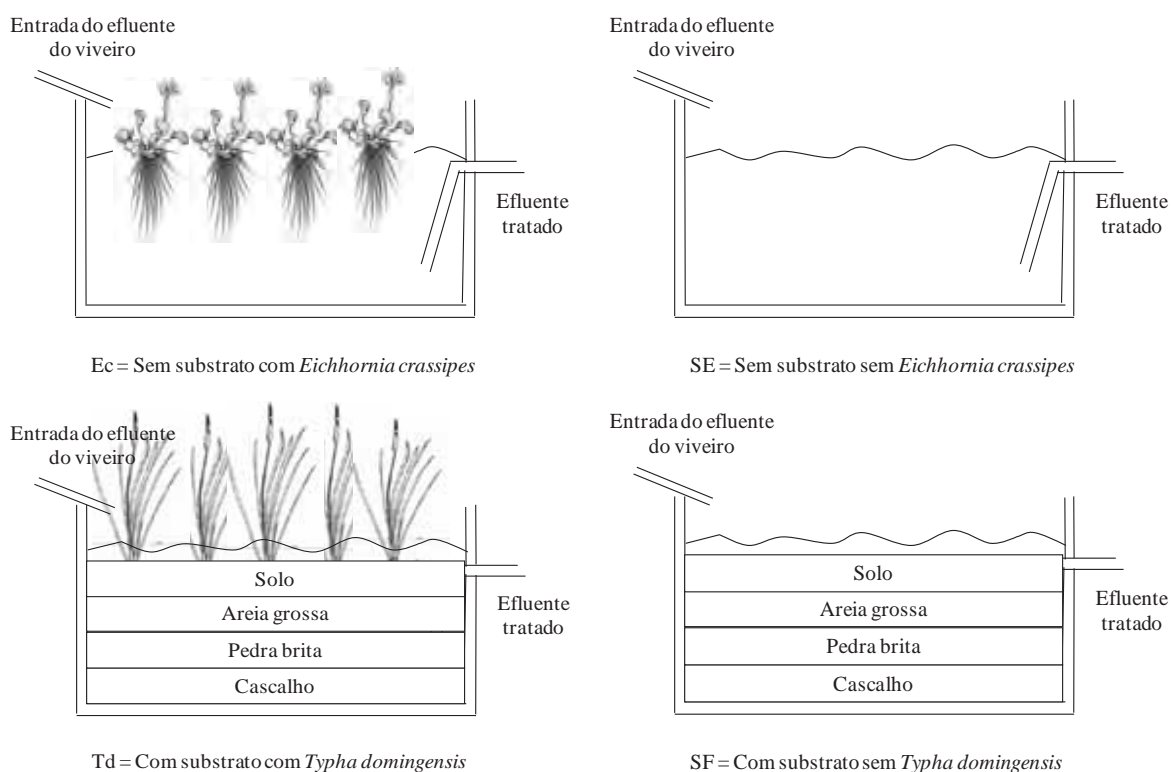


Figura 3. Desenho esquemático da composição das diferentes *wetlands*.

E. crassipes e *T. domingensis* utilizadas na colonização dos tanques foram coletadas em represas e áreas alagadas na região próxima ao Centro de Aquicultura da UNESP. A biomassa inicial de *E. crassipes* e *T. domingensis* preencheu aproximadamente 80% da superfície do tanque, o que corresponde à aproximadamente 5,0 kg de massa fresca/m² (250 g de massa seca/m²) no sistema Ec. No tratamento Td os indivíduos foram plantados com distância de 0,15 m entre um e outro. A biomassa inicial desta macrófita foi de aproximadamente 2,5 kg de massa fresca/m² (240 g de massa seca/m²).

2.1 Variáveis limnológicas

Em intervalos de 15 dias durante 12 semanas entre 07h00 e 09h00 foram coletadas (n = 3) 1 L de amostra da água do efluente do viveiro e mensurados os valores de temperatura (°C), condutividade elétrica (µS cm⁻¹), potencial hidrogeniônico (pH) e concentração de oxigênio dissolvido (OD) (mg L⁻¹) por meio do aparelho "Water Quality Checker", modelo U-10 da marca Horiba®. Foi considerado o tempo de residência do efluente nos sistemas de 12 horas. Sendo assim, entre 19h00 e 21h00 horas as mesmas variáveis medidas no efluente do viveiro foram medidas nos efluentes tratados pelas *wetlands*. Após mensurar as variáveis *in situ* e realizar as coletas de água, as amostras foram levadas ao laboratório para determinar a

turbidez (FTU), por meio do espectrofotômetro modelo HACH DR/2000. Aproximadamente 0,5 L de água foram filtrados em membrana filtro de fibra de vidro (Whatman GF 52-C) de $47 \pm 0,5$ mm de diâmetro e 0,6-0,7 μm de porosidade para a determinação da concentração de material particulado em suspensão (MPS) (APHA, 1998). Com as amostras filtradas também foram determinadas as concentrações de nitrogênio amoniacal (N-amoniacal) (Koroleff, 1976), nitrito (N-NO₂) e nitrato (N-NO₃) (Mackereth et al., 1978), P-ortofosfato (P-PO₄) e fósforo dissolvido (PD) (Golterman et al., 1978). As amostras não filtradas foram utilizadas para determinar as concentrações de nitrogênio Kjeldahl total (NKT) (Mackereth et al., 1978) e fósforo total (PT) (Golterman et al., 1978). Na entrada dos sistemas de tratamento foi calculado a carga (K) (mg dia⁻¹ ou g dia⁻¹) de MPS, N e P no efluente do viveiro conforme a equação (1).

$$K = [C] * Q \quad (1)$$

em que K = carga de MPS, N ou P (mg dia⁻¹ ou g dia⁻¹), [C] = concentração da variável considerada (mg L⁻¹ ou $\mu\text{g L}^{-1}$), Q = vazão do efluente do viveiro na entrada dos sistemas de tratamento.

Para cada sistema de tratamento foi calculada a carga (mg dia⁻¹ ou g dia⁻¹) de MPS, N e P removida (K_R) conforme a equação (2).

$$K_R = Q * (C_{EV} - C_{ET}) * 1440 \quad (2)$$

em que K_R = carga de MPS, N ou P removida (mg dia⁻¹ ou g dia⁻¹), Q = vazão do efluente tratado, C_{EV} = concentração da variável no efluente do viveiro (mg L⁻¹ ou $\mu\text{g L}^{-1}$), C_{ET} = concentração da variável na saída do sistema de tratamento (mg L⁻¹ ou $\mu\text{g L}^{-1}$).

Com os valores das cargas, foi calculada a porcentagem de remoção (%K_R) de MPS, N e P conforme a equação (3).

$$\%K_R = 100 - [(100 * K_{ET}) / K_{EV}] \quad (3)$$

em que %K_R = porcentagem de remoção da carga de MPS, N ou P (mg dia⁻¹ ou g dia⁻¹), K_{ET} = carga da variável considerada no efluente tratado (mg dia⁻¹ ou g dia⁻¹), K_{EV} = carga da variável considerada no efluente do viveiro (mg dia⁻¹ ou g dia⁻¹).

2.2 Estoque de N, P e matéria orgânica (MO) acumulados nos sistemas de tratamento e na biomassa das macrófitas

No início e no final do experimento foram coletadas amostras das macrófitas, do material sedimentado nos tanques e dos substratos. No sistema de tratamento com *E. crassipes* foram coletadas amostras da macrófita no início e no final do experimento e do material sedimentado no final do experimento. No sistema de tratamento por sedimentação

foram coletadas amostras do material sedimentado no final do experimento. No sistema com *T. domingensis* foram coletadas amostras da macrófita e do substrato (solo, areia grossa, pedra brita e cascalho) no início e no final do experimento e no sistema de tratamento com solo filtrante foram coletadas amostras do substrato no início e no final do experimento. As coletas de material sedimentado e do substrato foram realizadas com um cilindro de PVC com 0,8 m de comprimento e 78,5 cm² de área.

As amostras vegetais, o substrato e o material sedimentado foram acondicionados em estufa a 60° C até atingir peso constante. Posteriormente, foram pesados para determinar a massa seca em gramas/m² (g MS m⁻²). Em seguida as amostras foram homogeneizadas para determinar as concentrações de nitrogênio total em porcentagem de massa seca (N % MS) pelo método Kjeldahl (Allen et al., 1974) e concentrações de fósforo total (P % MS) (Allen et al., 1974). As concentrações de MO (% MS) foram determinadas pela incineração das amostras em forno mufla a 540 °C por 4 horas.

O estoque de N, P e MO (g de N, P ou MO m⁻²) nos sistemas de tratamento e na biomassa das macrófitas aquáticas foi calculado conforme a equação (4).

$$E = C * M/100 \quad (4)$$

em que E = estoque (g de N, P ou MO m⁻²), C = concentração (% MS) da variável considerada, M = massa seca (g).

O estoque de N, P e MO acumulado nas *wetlands* e na biomassa de macrófitas aquáticas foi calculado pela diferença entre o estoque no final e no início do experimento.

2.3 Análise Estatística

Aos valores médios de condutividade elétrica, turbidez, MPS, N-amoniaco, N-NO₂, N-NO₃, NKT, P-PO₄, PD e PT do efluente do viveiro (EV) e dos efluentes tratados nos sistemas Ec, SE, Td e SF foi aplicada Análise de Componentes Principais (ACP) (Bouroche & Saporta, 1982) com o objetivo de separar os diferentes sistemas de tratamento. Os dados da carga de MPS e das diferentes formas de N e P removida pelos sistemas de tratamento e os dados de acúmulo de N, P e MO nos tanques foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov e ao teste de Bartlett para verificar a normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Atendida as premissas os dados foram submetidos à Análise de Variância de uma classificação (ANOVA - *one way*) e, quando encontrada diferenças significativas entre as médias, ao teste de Tukey. O teste *t* para amostras independentes foi utilizado para comparar o estoque de N, P e MO acumulados na biomassa da *E. crassipes* e *T. domingensis*. O nível de probabilidade utilizado nos testes foi de 5%.

3. RESULTADOS

A Análise de Componentes Principais (ACP) resumiu 79,90% da variabilidade total dos dados em seus dois primeiros componentes. O primeiro componente (CP1) explicou 67,80% do total da variância encontrada, enquanto o segundo componente (CP2) explicou 12,10%. As variáveis turbidez, MPS, N-NO₂, N-NO₃, NKT, P-PO₄, PD e PT apresentaram negativamente correlacionadas com o CP1, enquanto condutividade elétrica e N-amoniacal foram correlacionadas negativamente com CP2. Todas as variáveis apresentaram correlacionadas a algum dos dois componentes com valor de coeficiente acima de 0,6 (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais em *wetlands* construídas para o tratamento do efluente do viveiro de manutenção de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii*.

Variáveis Limnológicas	Componente Principal	
	CP1	CP2
Condutividade elétrica	0,444041	-0,629152
Turbidez	-0,914989	0,222009
Material Particulado em Suspensão	-0,954317	0,214256
N-amoniacal	-0,544949	-0,636505
N-NO ₂	-0,810400	-0,284704
N-NO ₃	-0,859005	0,107407
NKT	-0,950648	0,180830
P-PO ₄	-0,679954	-0,367339
PD	-0,914127	-0,217463
PT	-0,970444	0,077293
Varição explicada (%)	67,80	12,10

O efluente do viveiro (agrupamento D) e o efluente tratado por sedimentação (agrupamento C) encontram-se à esquerda do gráfico da ACP, apresentando valores mais elevados das variáveis negativamente correlacionadas com CP1 (turbidez, MPS, N-NO₂, N-NO₃, NKT, P-PO₄, PD e PT). Entre esses dois agrupamentos os valores mais elevados dessas variáveis ocorreram no agrupamento D, posicionado mais à esquerda do gráfico. O efluente tratado pelo sistema Ec (agrupamento A), Td e SF (agrupamento B) encontram-se à direita do gráfico, ou seja, possui valores menores de turbidez, MPS, N-NO₂, N-NO₃, NKT, P-PO₄, PD

e PT, portanto, apresentaram características opostas às do efluente do viveiro e às do efluente tratado por sedimentação. O agrupamento B difere do A, pois este apresentou valores menores das variáveis correlacionadas negativamente com CP2 (condutividade elétrica e N-amoniaco) (Figura 4). A proximidade dos pontos de coleta observada no agrupamento A indica que o sistema de tratamento Ec apresentou menor variação da eficiência de redução das cargas das variáveis negativamente correlacionadas com CP1. Já os sistemas de tratamento Td e SF (agrupamento B) apresentaram os pontos de coleta mais dispersos no gráfico indicando que, embora tenha ocorrido redução da carga das variáveis negativamente correlacionadas com CP1, apresentou maior variação da eficiência no decorrer do experimento (Figura 4).

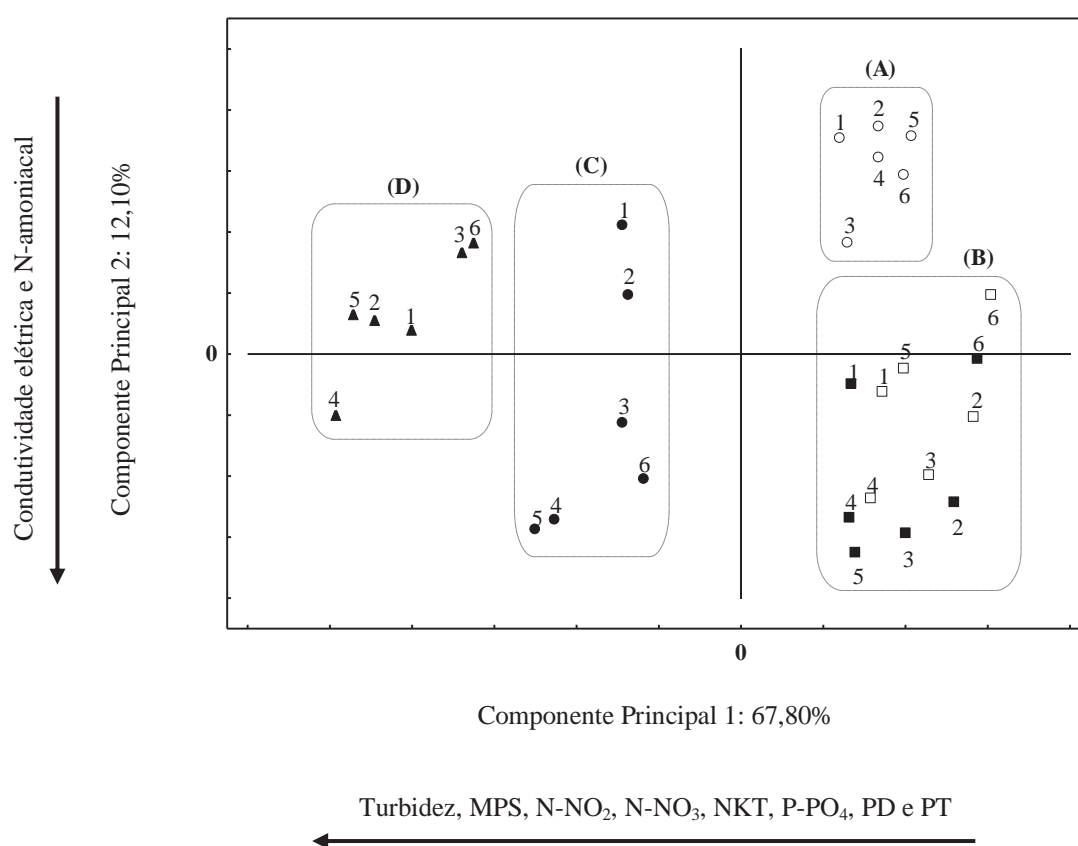


Figura 4. Ordenação pela Análise de Componentes Principais das variáveis limnológicas do efluente do viveiro e dos efluentes tratados. Efluente do viveiro (▲); efluente tratado no sistema Ec (○); efluente tratado por sedimentação (●); efluente tratado no Td (□); efluente tratado com solo filtrante (■). A, B, C e D = formação de 4 grupos; 1-6 = coletas. Os dois componentes explicaram 79,90% da variabilidade total dos dados (CP1 = 67,80% e CP2 = 12,10%).

O sistema de tratamento SE apresentou menor eficiência na remoção da carga de MPS e das formas de nitrogênio e fósforo (Tabela 2). Os sistemas com substrato (Td e SF)

removeram em média 81,6% da carga de MPS por dia, enquanto os sistemas Ec e SE removeram 66,0 e 41,4%, respectivamente. A carga de NKT removida nos sistemas Td e SF foi em média 2,3 vezes maior em comparação à carga removida no sistema por sedimentação e 1,3 vezes maior em comparação à carga removida no sistema Ec (Tabela 2). Os sistemas com macrófitas aquáticas (Ec e Td) foram mais eficientes na remoção das cargas de N-amoniacal e P-PO₄ (Tabela 2). O sistema de tratamento Ec removeu em média 37,9% da carga de N-amoniacal e o Td 18,1%. A carga removida de P-PO₄, nos sistemas Ec e Td foi de 38,5 e 31,5% dia, respectivamente. Para as demais formas de N (N-NO₂ e N-NO₃) e P (PD e PT) não ocorreu diferença significativa da carga removida nos sistemas Ec, Td e SF (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios (n = 18) da carga de material particulado em suspensão (MPS), N e P no efluente do viveiro (EV) e da carga removida no sistema de tratamento com *Eichhornia crassipes* (Ec), por sedimentação (SE), com *Typha domingensis* (Td) e substrato filtrante (SF).

Variáveis Limnológicas	Tratamentos					ANOVA
	EV	Ec	SE	Td	SF	Valor de F
MPS (g dia ⁻¹)	71,76	47,67 b	30,47 c	57,35 a	60,04 a	30,0***
N-amoniacal (mg dia ⁻¹)	34,20	12,97 a	0,42 c	6,78 ab	4,84 b	7,4***
N-NO ₂ (mg dia ⁻¹)	39,00	15,93 a	1,46 b	14,97 a	12,09 a	8,5***
N-NO ₃ (mg dia ⁻¹)	299,59	180,87 a	85,53 b	156,64 a	166,09 a	12,3***
NKT (g dia ⁻¹)	1,19	0,54 b	0,30 c	0,71 a	0,68 a	77,3*
P-PO ₄ (mg dia ⁻¹)	50,83	19,24 a	-2,80 c	16,28 ab	10,47 b	23,4***
PD (mg dia ⁻¹)	158,12	72,46 a	19,82 b	66,30 a	60,26 a	22,5***
PT (mg dia ⁻¹)	352,92	185,38 a	101,45 b	221,36 a	215,90 a	23,7***

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos. *Nível de significância ($P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$). Valor negativo indica que a carga da variável considerada foi maior no efluente tratado pelo sistema do que no efluente do viveiro.

Em relação à capacidade de estocagem de N, P e MO, o sistema SE também apresentou menor eficiência em comparação aos demais. O estoque de N nos sistemas Ec, Td e SF foi em média 2,9 vezes maior em comparação ao estoque no SE (Tabela 3). Já o estoque de P e MO foi significativamente ($P \leq 0,05$) maior nos sistemas Td e Ec, embora, para PT também não ocorreu diferença significativa do estoque acumulado nos sistemas Ec e SF (Tabela 3). O estoque de MO nos sistemas com macrófitas foi, em média, 1,3 vezes maior em comparação ao estoque no sistema SF e 3,1 vezes maior em comparação ao estoque no SE (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios (n = 3) e desvios padrão do estoque de nitrogênio (N), fósforo (P) e matéria orgânica (MO) acumulados nos sistemas de tratamento do efluente do viveiro.

Tratamentos	Estoque acumulado (g m ⁻²)		
	N	P	MO
<i>E. crassipes</i> (Ec)	34,24 ± 6,49 a	7,47 ± 1,04 ab	1725,0 ± 124,4 a
Sedimentação (SE)	12,02 ± 1,65 _b	3,85 ± 0,27 __c	558,2 ± 47,5 ___c
<i>T. domingensis</i> (Td)	40,06 ± 3,02 a	9,38 ± 1,76 a	1713,3 ± 158,4 a
Substrato Filtrante (SF)	30,84 ± 3,22 a	6,61 ± 0,40 _b	1317,9 ± 209,8 _b
Valor de F	27,4***	14,4**	41,4 ***

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos. *Nível de significância (** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

Com relação ao estoque de N, P e MO acumulado na biomassa das macrófitas, *E. crassipes* apresentou maior capacidade de estocagem em comparação à *T. domingensis*. Os estoques de N, P e MO foram, respectivamente, 2,1, 1,6 e 1,5 vezes maior na biomassa da *E. crassipes* (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios (n = 3) e desvios padrão do estoque de nitrogênio (N), fósforo (P) e matéria orgânica (MO) acumulados na biomassa de *E. crassipes* e *T. domingensis*.

Macrófitas aquáticas	Estoque acumulado (g m ⁻²)		
	N	P	MO
<i>Eichhornia crassipes</i>	13,44 ± 2,63*	2,36 ± 0,32*	733,42 ± 70,70*
<i>Typha domingensis</i>	6,48 ± 1,99	1,51 ± 0,29	486,67 ± 85,84

Diferença significativa ($P \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Wetlands construídas com *E. crassipes* e *T. domingensis* e sistemas de tratamento com substrato filtrante foram mais eficientes na redução da carga de MPS, N e P do efluente de reprodutores de *M. rosenbergii* (100 g m⁻²) do que os sistemas de tratamento por sedimentação. As reduções do MPS, nos sistemas Td e SF, estão relacionadas aos processos de filtração e adsorção dos detritos ao substrato. No sistema Ec, embora não tenha substrato, a remoção de MPS ocorre devido aos processos de sedimentação e adsorção dos detritos às raízes da macrófita. Os processos físicos de sedimentação e adsorção são os principais responsáveis pela remoção de sólidos em *wetlands* construídas (Kadlec & Knight, 1996; Kumar & Zhao, 2011). Entretanto, a eficiência desses sistemas na remoção dos detritos pode

apresentar grande variação em decorrência da espécie animal cultivada, da densidade de estocagem e do tempo de residência do efluente na *wetland*. Espécies com hábito de explorar os sedimentos dos ambientes de cultivo provocam a ressuspensão dos sólidos e, conseqüentemente, geram efluentes com elevadas concentrações de sólidos em suspensão; elevada densidade de estocagem exige o incremento na quantidade de dieta fornecida, que favorece a formação dos detritos; tempo de residência reduzido pode prejudicar os processos de sedimentação, precipitação e adsorção.

Na redução da concentração de N-amoniacal e N-NO₂, os sistemas Ec, Td e SF foram mais eficientes em comparação ao SE, provavelmente devido ao processo de nitrificação realizado por bactérias. As macrófitas aquáticas e os substratos possibilitam o desenvolvimento de comunidades bacterianas responsáveis pela transformação e mineralização da matéria orgânica, pois servem como substrato para a fixação dessas comunidades (Brix, 1997; Stottmeister et al., 2003). De fato, Iasur-Kruh et al. (2009) relataram que a interação dos microrganismos com as raízes das macrófitas (rizosfera) e outros substratos estabelece uma região de intensa atividade microbiológica que favorece o processo de nitrificação. Kadlec e Wallace (2009) ressaltam que o O₂ liberado pelas raízes das macrófitas é essencial para reações de oxidação, como a nitrificação. A redução da concentração de N-amoniacal e N-NO₂ através da nitrificação, em *wetlands* construídas e sistemas de tratamento com substratos, tem sido reportada por diversos autores (Davis & Arnold, 1998; Schulz et al., 2003; Eding et al., 2006). No tratamento do efluente do cultivo intensivo de *L. vannamei* com *T. angustifolia* e *P. australis* dispostas em série, Lin et al. (2005) atribuíram a redução de 64-66% de N-amoniacal e 83-94% de N-NO₂ ao processo de nitrificação.

No processo de nitrificação ocorre a formação do N-NO₃ (Lin et al., 2005), cuja remoção em *wetlands* construídas está relacionada à absorção pelas macrófitas aquáticas e ao processo de desnitrificação e amonificação (Kadlec & Knighth, 1996; Ran et al., 2004). As taxas de remoção de N-NO₃ nos sistemas Ec e SE indicam que o uso de *E. crassipes* aumenta significativamente a eficiência de sistemas de tratamento por sedimentação. Por outro lado, as taxas de remoção de N-NO₃ no Td e SF mostram que o uso de *T. domingensis* não aumenta a eficiência do sistema com solo filtrante. O mesmo resultado pode ser observado para as taxas de remoção de NKT e PT, que foram semelhantes nos sistemas Td e SF, mas foi maior no Ec em comparação ao SE. A eficiência do sistema Ec na redução da carga de N se deve à maior capacidade da *E. crassipes* absorver e estocar nutrientes em sua biomassa (Gopal, 1990). A produção de biomassa é uma das principais características para aumentar a remoção de N e P

em *wetlands* construídas (Henry-Silva & Camargo, 2006). Dessa forma, embora as taxas de remoção de NKT e PT foram levemente maiores nos sistemas Td e SF, a elevada capacidade da *E. crassipes* estocar nutrientes resultou em maior estoque de N e P em sua biomassa.

Os valores do estoque de fósforo nos sistemas Ec e Td indicam que a macrófita aquática favorece a redução desse nutriente, provavelmente, devido à absorção das formas inorgânicas. No entanto, no balanço de massa do P em *wetland* construída para o tratamento do efluente doméstico, a remoção de P via absorção pelas macrófitas representou apenas 1% da quantidade total removida (Chung et al., 2008). Babatunde e Zhao (2009) relataram que a principal via de remoção de P, em *wetlands* construídas, é a adsorção do P ao substrato. A adsorção do P aos detritos, argilas, compostos orgânicos e carbonatos representa a principal forma de mobilização e imobilização dos íons fosfatos em ecossistemas aquáticos rasos (Esteves & Panosso, 2011). De fato, a semelhança dos valores do estoque de P nos sistemas Ec e SF indica que o substrato favorece a remoção de P. Contudo, a remoção de P, principalmente na forma P-PO₄, nos sistemas Ec e Td sugere que as plantas aumentam a eficiência do sistema. Resultados semelhantes foram observados por Chung et al. (2008) na remoção de P-PO₄ e PT do efluente doméstico (3,89 e 3,42 mg L⁻¹ de P-PO₄ e PT, respectivamente) tratado com *Typha latifolia*. Esses autores constataram que a remoção de P-PO₄ variou de 72 a 79% no sistema com macrófita e de 33 a 44% no sistema sem a *T. latifolia*. Para PT, Chung et al. (2008) observaram remoção de 54 a 68% no sistema com macrófita e de 10 a 11% no sistema sem a planta. A remoção de fósforo do efluente (0,033 mg L⁻¹ de PD e 0,23 mg L⁻¹ PT) de um viveiro de reprodutores de *M. amazonicum* também foi maior em *wetlands* colonizadas com macrófitas aquáticas do que em sistemas de tratamento sem macrófitas (Henry-Silva & Camargo, 2008). Esses autores notaram que a porcentagem de remoção de PD e PT foi em média 2,0 e 1,7 vezes maior nos sistemas colonizados com *E. crassipes* e *P. stratiotes* do que nos sistemas de tratamento por sedimentação.

Em *wetlands* colonizadas por macrófitas aquáticas emersas a principal via de remoção do P pode estar relacionada à adsorção ao substrato, no entanto, em sistemas com macrófitas flutuantes, o P disponível na água (não adsorvido), principalmente na forma inorgânica (P-ortofosfato - P-PO₄), favorece o crescimento das plantas com consequente redução da concentração na coluna d'água. Portanto, a eficiência dos sistemas com macrófitas está relacionada à capacidade das plantas absorverem e estocarem nutrientes em sua biomassa. Essa capacidade proporciona o aumento da biomassa vegetal, o que representa umas das principais características no aumento da eficiência do sistema de tratamento (Henry-Silva & Camargo, 2008). Por outro lado, com o decorrer do tempo o incremento da biomassa vegetal

exige o manejo da *wetland* com retirada de parte da biomassa. Ibekwe et al. (2007) relataram que, em *wetlands* construídas, o manejo de retirada da biomassa vegetal aumenta a eficiência de remoção de N-NO₃ e ortofosfato, pois favorece o crescimento da macrófita. Assim, é interessante a utilização de macrófitas aquáticas que, além da elevada capacidade de estocar nutrientes e aumentar sua biomassa, facilitem o manejo do sistema. Espécies flutuantes como *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *Salvinia* sp. apresentam grande potencial em *wetlands* construídas (Ran et al., 2004; Henry-Silva & Camargo, 2006 e 2008; Zimmels et al., 2009) e são fáceis de manipular na retirada da biomassa excedente, ao contrário das espécies enraizadas (*Typha* spp., *Phragmites* spp. e *Cyperus giganteus*). Além da facilidade de manejo, as taxas de remoção das diferentes formas de N (exceto NKT) e P e o estoque de N, P e MO na biomassa da *E. crassipes* sugere que *wetlands* construídas e colonizadas com esta espécie devem ser utilizadas para o tratamento do efluente de viveiros de reprodutores de *M. rosenbergii* mantidos na densidade média de 100 g m⁻².

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen S.E., Grinshaw H.M., Parkinson J.A. & Quarmby C. 1974. *Chemical Analysis of Ecological Materials*. Blackwell, Oxford, 565 p.
- American Public Health Association - APHA. 1998. *Standart methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. APHA, Washington. 1220 p.
- Babatunde A.O. & Zhao Y.Q. 2009. Forms, patterns and extractability of phosphorus retained in alum sludge used as substrate in laboratory-scale constructed wetland systems. *The Chemical Engineering Journal*, Lausanne, 152, 8-13.
- Babatunde A.O., Zhao Y.Q. & Zhao X.H. 2010. Alum sludge-based constructed wetland system for enhanced removal of P and OM from wastewater: Concept, design and performance analysis. *Bioresource Technology*, Essex, 101, 6576-6579.
- Biudes J.F.V., Camargo A.F.M. & Henares M.N.P. 2011. Impact of maintenance of *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879 (Crustacea, decapoda, Palaemonidae) broodstock on the water used in culture pond. *Brazilian Journal of Biology*, 71, 857-863.
- Bouroche J.M. & Saporta G. 1982. *Análise de dados*. Zahar, Rio de Janeiro. 116 p.
- Boyd C.E., Tucker C.S., McNevin A., Bostick K. & Clay J. 2007. Indicators of resource use efficiency and environmental performance in fish and crustacean aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, Philadelphia, 15, 327-360.

- Brinker A., 2005. *Suspended Solids in Flow-Through Aquaculture - Dynamics and Management*. Hartung-Gorre Verlag, Konstanz, 136 pp.
- Brix H. 1997. Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands. *Water Science Technology*, Oxford, 35, 11-17.
- Canary A.C.C., Porsh L. & Wasielesky Jr.W. 2009. Impactos dos efluentes semi-intensivo de camarão sobre a fauna bentônica no sul do Brasil. *Acta Scientiarum, Biological Science*, Maringá, 31, 345-353.
- Chung A.K.C., Wu Y., Tam N.F.Y. & Wong M.H. 2008. Nitrogen and phosphate mass balance in a sub-surface flow constructed wetland for treating municipal wastewater. *Ecological Engineering*, Oxford, 32, 81-89.
- Davis D. & Arnold C. 1998. The design, management and production of recirculating raceway system for the production of marine shrimp. *Aquacultural Engineering*, Essex, 17, 193-211.
- 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 system. *Aquaculture*, Amsterdam, 257, 346-358.
- Eding E.H., Kamstra A., Verreth J.A.J., Huisman E.A. & Klapwijk A. 2006. Design and operation of nitrifying trickling filters in recirculating aquaculture: A review. *Aquacultural Engineering*, Essex, 34, 234-260.
- Esteves F.A. & Panosso R. 2011. Fósforo. In: *Fundamentos de limnologia*. (Esteves F.A. - coordenador) 3ª. ed. Rio de Janeiro, Interciência, 826p.
- Findlay D.L., Podemski, C.L. & Kasian E.M. 2009. Aquaculture impacts on the algal and bacterial communities in small boreal forest lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, Ottawa, 66, 1936-1948.
- Golterman H.L., Clyno R.S. & Ohnsstad M.A.M. 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. 2nd ed. Blackwell, Oxford. 315 p.
- Gopal B. 1990. *Aquatic weed problems and management in Asia*. In: Pieterse, A.H. & Murphy, K.J. (Ed.) *Aquatic weeds: the ecology and management of nuisance aquatic vegetation*. Oxford: Oxford University Press, p. 318-340.

- Henares M.N.P., Camargo A.F.M., Biudes J.F.V., Valenti W.C. 2011. Impacto da manutenção de reprodutores de *Macrobrachium rosenbergii* na qualidade da água. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo, 37, 183-190.
- Henry-Silva G.G. & Camargo A.F.M. 2006. Efficiency of aquatic macrophyte to treat Nile tilapia pond effluents. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 63, 433-438.
- Henry-Silva G.G. & Camargo, A.F.M. 2008 Tratamento de efluentes de carcinicultura por macrófitas aquáticas flutuantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 37, 181-188.
- Iasur-Kruh L., Hadar Y., Milstein D., Gasith A., Minz D. 2009. Microbial population and activity in wetland microcosm constructed for improving treated municipal wastewater. *Environmental Microbiology*, Oxford, doi: 10.1007/s00248-009-9611-z
- Ibekwe A.M., Lyon S.R., Leddy & Meyers-Jacobson M. 2007. Impact of plant density and microbial composition on water quality from a free water surface constructed wetland. *Journal of applied Microbiology*, Oxford, 102, 921-936.
- Kadlec R.H., Knight R.L. 1996. *Treatment wetlands*. Lewis Publishers, Boca Raton, New York. 893 pp.
- Kadlec R.H. & Wallace S. 2009. *Treatment Wetlands*. 2^a. ed. Lewis Publishers, Boca Raton, New York, FL.
- Konnerup D., Trang N.T.D. & Brix H. 2011. Treatment of fish pond water by recirculating horizontal and vertical flow constructed wetlands in the tropics, *Aquaculture*, Amsterdam, doi:10.1016/j.aquaculture.2010.12.026
- Koroleff F. 1976. Determination of nutrients. In: Grasshoff, K. (ed.). *Methods of seawater analysis*. Verlag. Chemie Weinheim, New York, p. 117-181.
- Kumar J.L.G. & Zhao Y.Q. 2011. A review on numerous modeling approaches for effective, economical and ecological treatment wetlands. *Journal of Environmental Management*, London, 92, 400-406.
- Lin Y.F., Jing S.R., Lee D.Y., Chang Y.F., Chen Y.M. & Shih K.C. 2005. Performance of a constructed wetland treating intensive shrimp aquaculture wastewater under high hydraulic loading rate. *Environmental Pollution*, Barking, 134, 411-421.
- Mackereth F.I.F., Heron J. & Talling J.F. 1978. *Water analysis: some revised methods for limnologist*. Freshwater Biological Association, Ambleside, 121 p.

- Phan L.T., Bui T.M., Nguyen T.T.T., Gooley G.L., Ingram B.A., Nguyen H.V., Nguyen P.T. & De Silva S.S. 2009. Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture*, Amsterdam, 296, 227-236.
- Ran M., Agami M. & Oron G. 2004. A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L.) for treatment of domestic primary effluent in Israel. *Water Research*, New York, 38, 2241-2248.
- Schulz C., Gelbrecht J. & Rennert B. 2003. Treatment of rainbow trout farm effluents in constructed wetland with emergent plants and subsurface horizontal water flow. *Aquaculture*, Amsterdam, 217, 207-221.
- Shutes R.B.E. 2001. Artificial wetlands and water quality improvement. *Environment International*, New York, 26, 441-447.
- Sindilariu P.D., Schulz C. & Reiter R. 2007. Treatment of flow-through trout aquaculture effluents in a constructed wetland. *Aquaculture*, Amsterdam, 270, 92-104.
- Sousa W.T.Z., Panitz C.M.N. & Thomaz S.M. 2011. Performance of pilot-scale vertical flow constructed wetlands with and without the emergent macrophyte *Spartina alterniflora* treating mariculture effluent. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, 54, 405-413.
- Stottmeister U., Wiebner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kastner M., Bederski O., Muller R.A. & Moormann H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, Oxford, 22, 93-117.
- Zachritz W.H., Hanson A.T., Saucedo J.A. & Fitzsimmons K.M. 2008. Evaluation of submerged surface flow (SSF) constructed wetlands for recirculating tilapia production system. *Aquacultural Engineering*, Essex, 39, 16-23.
- Zimmels Y., Kirzhner F. & Kadmon, A. 2009. Effect of circulation and aeration on wastewater treatment by floating aquatic plants. *Separation and Purification Technology*, 66, 570-577.

Capítulo IV

**IDENTIFICAÇÃO DAS COMUNIDADES BACTERIANAS EM WETLAND
CONSTRUÍDA E COLONIZADA COM *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms**

**IDENTIFICATION OF BACTERIAL COMMUNITY IN CONSTRUCTED WETLAND
WITH *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms**

RESUMO

Nas *wetlands* construídas (WC's) as macrófitas aquáticas desempenham papel importante na remoção de nitrogênio e fósforo, embora sejam os microrganismos os principais responsáveis pela transformação e mineralização da matéria orgânica. O objetivo deste trabalho foi identificar as comunidades bacterianas de uma WC (2m²) colonizada com a macrófita aquática flutuante *Eichhornia crassipes* para o tratamento do efluente de um viveiro de manutenção de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii*. Para identificar as comunidades bacterianas foi realizada uma coleta no início do experimento (fevereiro) denominada de WTI e uma ao final (abril) denominada de WTF. Em cada período de amostragem foram coletados, aleatoriamente, 5 litros do efluente no interior da WC. O volume coletado foi submetido à filtração e extração do DNA metagenômico por meio do kit UltraClean™ Water DNA Isolation Kit (0.22 µm) (Mobio Laboratories). A diversidade bacteriana no início e final do experimento foi comparada por meio do índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'). No início do experimento foram identificados 4 filos (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* e *Verrucomicrobia*), enquanto no final 6 filos (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *ODI*, *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia*). O filo *Actinobacteria* foi mais representativo no início e final do experimento com 75 (51,38%) e 57 (39,86%) clones, respectivamente. O valor do índice de Shannon foi maior em WTF ($H' = 3,73$) do que WTI ($H' = 3,60$). Esses resultados indicam que *wetland* construída para o tratamento de efluente de viveiro de manutenção de reprodutores de *M. rosenbergii* apresenta maior diversidade de filos no final do tratamento.

Palavras-chave: efluente, metagenoma, gene *16S* rRNA, diversidade, macrófitas aquáticas

ABSTRACT

In the constructed *wetlands* (CW) the aquatic macrophytes have an important role in the removal of nitrogen and phosphorus, although the microorganisms are the main responsible for transformation and mineralization of organic matter. The aim of this study was identify the bacterial communities of a CW (2m²) with the floating aquatic macrophyte *Eichhornia crassipes* used to treat the pond effluent of the maintenance broodstock shrimp *Macrobrachium rosenbergii*. To indentify the bacterial communities was done a sample at the beginning of the experiment (in February) called WTI and a sample at end of experiment (in April) called WTF. In each sample period were randomly collected five litters of effluent within CW. The volume of effluent water collected was sent to filtration and DNA metagenomics extraction through UltraClean™ Water DNA Isolation Kit (0.22 µm) (Mobio Laboratories) Kit. The bacterial diversity in the beginning and end of experiment was compared using the Shannon-Weaver (H') diversity index. In the beginning of experiment were identified four phylum (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia*) and at end of experiment six phylum (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *ODI*, *Fusobacteria* and *Verrucomicrobia*). The *Actinobacteria* phylum was the most representative in the beginning and end of experiment with 75 (51.38%) and 57 (39.86%) clones, respectively. The Shannon index value was higher in the WTF ($H' = 3.73$) than WTI ($H' = 3.60$). These results suggest that the constructed wetland used to treat the effluent of maintenance broodstock of *M. rosenbergii* presents higher phylum diversity at end of the experiment.

Key-words: effluent, metagenomics, *16S* rRNA gene, diversity, aquatic macrophytes

1. INTRODUÇÃO

Os alagados artificiais, *wetlands* construídas (WC's), têm sido utilizados no tratamento de efluentes em diversas partes do mundo desde 1950 (Vymazal, 2009) devido ao baixo custo de operação e manutenção (Kumar & Zhao, 2011). Nesses sistemas, a redução da concentração de nitrogênio, fósforo, matéria orgânica e sólidos em suspensão ocorre por meio da absorção direta dos nutrientes pelas macrófitas aquáticas, aos processos microbiológicos e à precipitação, sedimentação e adsorção do material particulado ao substrato e às macrófitas (Kadlec & Knigh, 1996; Babatunde et al., 2009).

As macrófitas aquáticas desempenham papel importante na absorção do nitrogênio e fósforo (Kadlec et al., 2000), embora, sejam os microrganismos os principais responsáveis pela transformação e mineralização da matéria orgânica (Calheiros et al., 2009). Nas WC's a interação e a fixação dos microrganismos às raízes das macrófitas aquáticas (rizosfera) e a outros substratos favorecem os processos oxidativos (Kadlec & Wallace, 2009). Nessas regiões, os microrganismos, incluindo bactérias decompositoras, nitrificantes e desnitrificantes, realizam os processos biológicos que transformam e mineralizam os compostos orgânicos (Faulwetter et al., 2009).

Os processos de transformação e mineralização, além de favorecerem a redução da carga de N, P e matéria orgânica, são fundamentais nos ciclos biogeoquímicos e no fluxo de energia dos ecossistemas aquáticos (Moriarty, 1997; Stottmeister et al., 2003). Embora, diversos estudos relatem a importância dos microrganismos nas WC's (Greenway, 2005; Zhou et al., 2009; Allen et al., 2010), atualmente é que tem-se intensificado os estudos relacionados à diversidade e às características das comunidades bacterianas em ecossistemas aquáticos, *wetlands* natural e construída (Baik et al., 2008; Sleytr et al., 2009; Iasur-Kruh et al., 2009; Zhao et al., 2010).

O tratamento do efluente de aquicultura com WC's tem sido reportado com sucesso por diversos autores, principalmente na remoção de nitrogênio, fósforo, material particulado em suspensão, matéria orgânica (Naylor et al., 2003; Lin et al., 2005) e alguns organismos patogênicos (Vacca et al., 2005, Pinto et al., 2009). Macrófitas aquáticas emersas (*Ipomoea aquatica* e *Paspalum vaginatum*) removeram em média 68 a 99% da concentração de N-nitrato (N-NO₃) e 32 a 71% de P-ortofosfato (P-PO₄) do efluente de *Chanos chanos* (Lin et al., 2002). Macrófitas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) removeram do efluente de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) 42,7 a 46,1% de nitrogênio total (NT) e 72,1 e 83,3% de fósforo total (PT) (Henry-Silva & Camargo, 2006). O uso de *E.*

crassipes para o tratamento do efluente de um viveiro de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) removeu 88,2% de *Escherichia coli* (Pinto et al., 2011).

Embora diversos trabalhos demonstrem a eficiência das WC's para o tratamento de efluente de cultivo de organismos aquáticos, a determinação das variáveis limnológicas aplicadas à aquicultura não é suficiente para a completa compreensão do funcionamento desses sistemas. Assim, a aplicação de técnicas moleculares permite identificar as comunidades bacterianas e compreender suas funções ecológicas nas WC's. O objetivo deste trabalho foi identificar as comunidades bacterianas de uma *wetland* construída e colonizada com *Eichhornia crassipes* para o tratamento do efluente de um viveiro de manutenção de reprodutores do camarão *Macrobrachium rosenbergii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante 12 semanas (fevereiro à abril de 2008) em Jaboticabal (SP/Brasil) (21° 15'22"S e 48°18'48"W). O efluente foi proveniente de um viveiro de fundo natural, 193 m² e profundidade média de 1,1 m (212,3 m³). O solo do viveiro é classificado como latossolo vermelho escuro com predominância de textura argilosa (58,1%). O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é mesotérmico de inverno seco e verão quente (Cwa), com precipitação média entre 1.100 e 1.700 mm anuais e temperaturas médias do mês mais quente de 22°C e do mês mais frio 18°C. As médias mensais dos valores de temperatura nos meses de fevereiro, março e abril foram de 25,0; 24,1 e 23,4°C, respectivamente. A precipitação foi maior em fevereiro com 302,7 mm. Em março a precipitação foi de 108,4 mm em abril 126,4 mm.

Dois represas localizadas a montante foram utilizadas para o abastecimento de água do viveiro. A vazão da água na entrada do viveiro foi de aproximadamente em $34,9 \pm 0,3$ L min⁻¹. Nessa vazão a taxa de renovação diária foi de aproximadamente 24% do volume total de água do viveiro. Os camarões reprodutores da espécie *M. rosenbergii* com peso médio de 40 g indivíduo⁻¹ foram mantidos na densidade média de 100 g m⁻² e alimentados, diariamente às 16:00 horas com dieta comercial peletizada composta por 37% de proteína bruta (mínimo). A quantidade fornecida foi equivalente a 4% da biomassa total dos reprodutores no viveiro.

Eichhornia crassipes utilizada na colonização da *wetland* foi coletada em represas do Centro de Aquicultura da UNESP. A biomassa inicial de *E. crassipes* preencheu aproximadamente 80% da superfície do tanque, o que corresponde à aproximadamente 5,0 kg

de massa fresca/m² (250 g de massa seca/m²). O sistema de tratamento foi constituído por 1 tanque de fibra vidro com capacidade para 2 m³ (1,0 m de largura, 2,0 m de comprimento e 1,0 m de profundidade). O nível do efluente no interior do tanque permaneceu aos 0,8 m e o tempo de residência do efluente na *wetland* foi de 12 horas, com vazão de 2,2 L min⁻¹, ajustada e controlada por registros hidráulicos instalados na entrada do tanque. O efluente do viveiro foi conduzido por gravidade até a *wetland*. O esquema da *wetland* é apresentado na Figura 1.

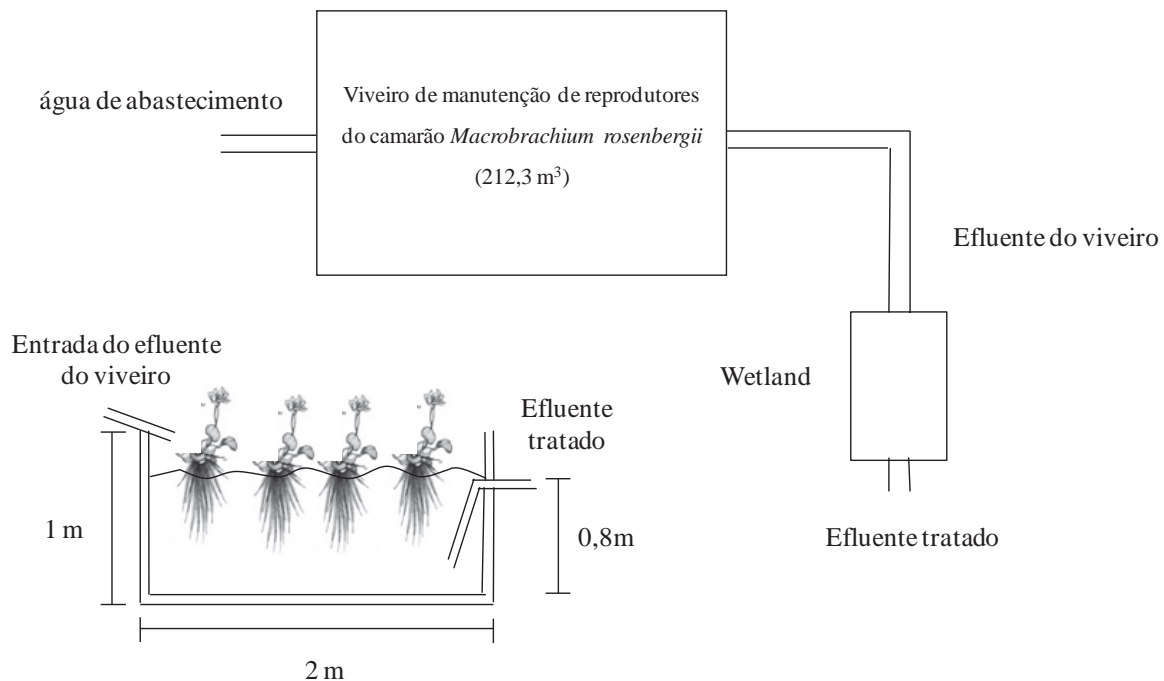


Figura 1. Esquema do sistema de tratamento do efluente do viveiro.

2.1 Estratégia de coleta das amostras ambientais

A diversidade bacteriana da *wetland* foi estimada por meio de duas coletas, sendo a primeira realizada no início do experimento (fevereiro) denominada de WTI e a segunda ao final do experimento (abril) denominada WTF. Com o auxílio de uma garrafa de Van Dorn (1 L) foram coletados aleatoriamente, em diferentes regiões do interior da *wetland*, 5 amostras do efluente. Posteriormente, essas amostras foram homogeneizadas totalizando um volume final de 5 litros.

2.2 Extração do DNA metagenômico da *wetland* e amplificação do gene *16S rRNA*

O volume coletado, inicialmente foi filtrado em membrana de fibra de vidro (Whatman GF 52-C) de $47 \pm 0,5$ mm de diâmetro e 0,6 - 0,7 μ m de porosidade para a

remoção dos sólidos suspensos conforme descrito por Baik et al. (2008). Posteriormente, o DNA metagenômico das bactérias do início (WTI) e do final do experimento (WTF) foi extraído por meio do kit UltraClean[®] Water DNA Isolation Kit (0.22 µm), seguindo as instruções do fabricante. O DNA metagenômico foi utilizado na amplificação do gene *16S rRNA* pelo método da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Na reação foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores universais 8F (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') e 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGGTCAG-3') (Lane, 1991). A reação de PCR foi realizada com kit Taq DNA polimerase (Promega, USA). Para isso, foi utilizado o termociclador MJ Research Inc., modelo PTC - 200 com o seguinte programa: 94°C por 2 min, 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 55°C por 50 seg, 72°C por 2 min e 72°C por 5 min. Os fragmentos (900 pb) gerados foram confirmados por eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg mL⁻¹ de brometo de etídeo, em tampão TBE (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2.5 mM, pH 8,3) e visualizado em um fotodocumentador Gel Doc 1000 (Bio Rad, USA) com luz UV.

2.3 Clonagem e sequenciamento parcial do gene *16S rRNA*

O produto amplificado do gene *16S rRNA* foi clonado em vetor pGEM-T Easy (Promega, USA) seguindo as instruções do fabricante. Células de *Escherichia coli* DH5α competentes foram utilizadas para transformação (Hanahan, 1983). Os clones transformantes foram selecionados em placas contendo meio Luria Bertani (LB) sólido com ampicilina (100 µg mL⁻¹).

Os clones selecionados foram repicados em 1 mL de meio Circle Grow (CG) contendo ampicilina (100 µg mL⁻¹) e cultivados durante 22 horas a 37°C sob agitação de 250 rpm. O DNA plasmidial foi extraído segundo Sambrook e Russell (2001) e purificado usando filtros MultiScreen (Millipore). Os plasmídios contendo os fragmentos de 16S rDNA foram sequenciados usando DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare); 10 pmols dos oligonucleotídeos T7 promoter sequencing iniciador (20-mer) e SP6, utilizados em reações distintas; 150 ng de DNA plasmidial num volume final de 10 µL. As condições no termociclador foram: 2 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C por 30 seg, 50°C por 15 seg, 60°C por 2 min. As amostras foram precipitadas com isopropanol 75%, lavadas com etanol 70% e submetidas ao sequenciador ABI 3700 (Applied Biosystems, USA).

2.4 Análise da Diversidade

A avaliação da qualidade das sequências obtidas e construção dos contigs foi realizada pelo pacote de programas Phred/Phrap (Ewing et al., 1998; Ewing & Green, 1998) utilizando como critério de qualidade $\text{Phred} \geq 20$. A visualização dos contigs foi realizada pelo programa Consed (Gordon et al., 1998).

As sequências foram comparadas com o banco de dados de genes ribossomais do Ribosomal Database Project II (Cole et al., 2009), por meio do programa *Classifier* (Wang et al., 2007). O filograma (dendrograma construído a partir dos grupos de filós) foram alinhados usando o programa ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1997). O dendrograma foi construído com o auxílio do programa Mega 4 (Tamura et al., 2007) usando o algoritmo do vizinho mais próximo *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) e o modelo de substituição de nucleotídeo Kimura 2-P (Kimura, 1980). O resultado do alinhamento também serviu para construir uma matriz de distâncias, usando o programa DNAdist (Felsenstein, 1989). A matriz gerada foi utilizada como entrada de dados para o programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) para análise de suficiência amostral da diversidade.

A diversidade foi estimada por meio do índice de Shannon-Weaver (H') (Shannon & Weaver, 1949) conforme a seguinte equação:

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$$

em que H = índice de diversidade de Shannon-Weaver; S = número total de ordens (riqueza) e P_i = número de indivíduos da ordem i em relação ao total de ordens.

As sequências de 16S rDNA obtidas neste estudo foram cadastradas no Banco Internacional de Genes (GenBank) e receberam os seguintes números de acesso: HM346214-HM346292 e HM 346294 – HM 346359 para WTI e HM486175-HM486317 para WTF.

3. RESULTADOS

A diversidade bacteriana foi analisada por meio de bibliotecas do gene *16S rRNA*. Os fragmentos de 16S rDNA amplificados apresentaram tamanhos de aproximadamente 900 pb, conforme esperado. Entretanto, quando submetidas ao pacote de programas Phred/Phrap e visualizadas pelo Consed, foram selecionadas sequências consenso de cada clone com média de 850 nucleotídeos. De acordo com o GenBank, todas as sequências cadastradas não apresentaram similaridade com sequências quiméricas. A comparação das sequências obtidas com as sequências disponibilizadas pelo banco de dados *Ribosomal Database Project II* (RDP) mostrou que todas as sequências analisadas pertencem ao domínio Bactéria.

As bibliotecas construídas com o gene *16S rRNA* resultaram em um total de 289 clones, sendo 146 sequências da biblioteca WTI e 143 WTF. Todas as sequências, assim como seu número de cadastro no GenBank são apresentadas nas Figuras 2 e 3.

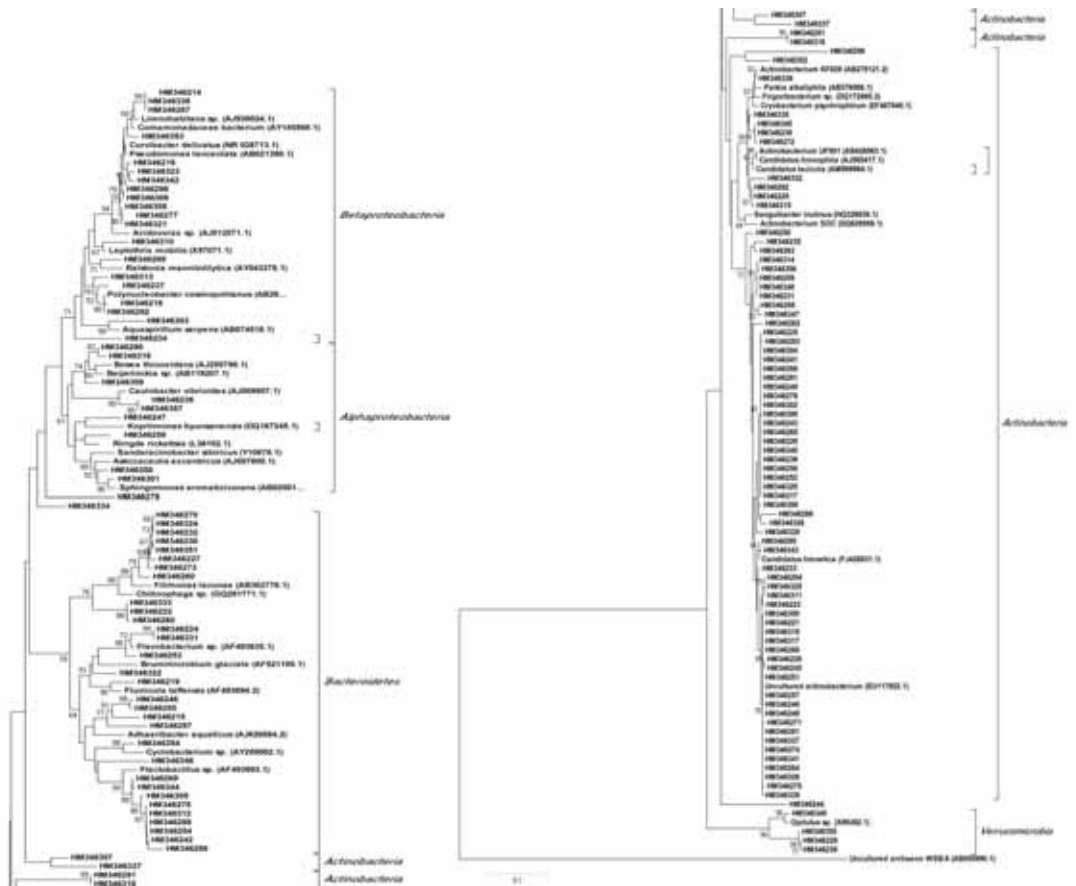


Figura 2. Filograma das sequencias parciais do gene *16S rRNA* da biblioteca WTI. A sequencia Uncultured archaeon WSB-8 (AB05590.1) foi usado como grupo externo.

A análise dos fragmentos de 16S rDNA identificou 4 filios no início do experimento e 6 no final. No início o filo *Actinobacteria* foi o mais representativo com 75 clones (51,38%), seguido pelos filios *Proteobacteria* com 33 clones (22,60%), *Bacteroidetes* 31 clones (21,23%) e *Verrucomicrobia* 4 clones (2,74%). Na biblioteca WTF o filo *Actinobacteria* também foi o mais representativo com 57 clones (39,86%), seguido pelos filios *Bacteroidetes* 39 clones (27,29%), *Proteobacteria* 36 (25,17%), *ODI* 5 (3,50%) e *Fusobacteria* e *Verrucomicrobia* com 1 clone (0,7 %). Os filios *ODI* e *Fusobacteria* foram observados somente no final do experimento. Do total de 289 sequencias, apenas 7 clones (2,42%) não foram classificadas em nível de filo (Tabela 1).

Entre as classes identificadas no filo *Proteobacteria* estão *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* e *Gammaproteobacteria*. No início do experimento não foi identificado representantes da classe *Gammaproteobacteria*. O segundo filo com maior representatividade em relação ao número de classes foi o *Bacteroidetes* com 2 classes, *Flavobacteria* e *Sphingobacteria*, ambas com representantes na *wetland* no início e final do experimento. O filo *Verrucomicrobia*, também, apresentou 2 classes (*Opiritutae* e *Spartobacteria*), porém a classe *Opiritutae* ocorreu somente no início, enquanto a classe *Spartobacteria* somente no final do experimento. Nos demais filios foram identificados apenas 1 classe, sendo *Actinobacteria* com maior representatividade no início e final do experimento com 75 e 57 clones, respectivamente (Tabela 1).

O valor do índice de diversidade de Shannon-Weaver (H') foi maior no final do experimento em relação ao inicial (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação dos filios e classes identificadas no início (WTI) e no final (WTF) do experimento.

Domínio Bactéria		Número de clones			
Filo	Classe	WTI	%	WTF	%
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	9	6,16	8	5,60
	<i>Betaproteobacteria</i>	24	16,44	27	18,88
	<i>Gammaproteobacteria</i>	0	0	1	0,69
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacteria</i>	5	3,42	11	7,69
	<i>Sphingobacteria</i>	26	17,81	28	19,60
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Opitutae</i>	4	2,74	0	0,69
	<i>Spartobacteria</i>	0	0	1	0,69
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	75	51,38	57	39,86
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>	0	0	1	0,69
<i>ODI</i>	<i>ODI</i>	0	0	5	3,50
Não classificadas		3	2,05	4	2,80
Total de clones		146	100,0	143	100,0
Diversidade Shannon-Weaver (H')		3,60		3,73	

A análise das sequencias também mostrou que há uma variabilidade nas ordens identificadas entre as bibliotecas estudadas. No início do experimento, no filo *Proteobacteria*, a classe *Betaproteobacteria* foi dividida entre as ordens *Neisseriales* e *Burkholderiales*. Para a classe *Alphaproteobacteria* as ordens identificadas foram *Rhizobiales*, *Sphingomonadales*, *Rickettsiales* e *Caulobacterales* (Figura 4). Embora, o número de clones associados à classe *Betaproteobacteria* tenha sido maior em relação à classe *Alphaproteobacteria*, nesta foi observado número maior de ordens. Nas demais classes *Sphingobacteria*, *Flavobacteria*, *Actinobacteria* e *Opitutae* foram identificadas uma única ordem, *Sphingobacteriales*, *Flavobacteriales*, *Actinomycetales* e *Opitutae*, respectivamente (Figura 4).

No final do experimento, na classe *Betaproteobacteria* foram identificadas as ordens *Burkholderiales* e *Methylophilales*, enquanto na classe *Alphaproteobacteria* destacaram as ordens *Sphingomonadales* e *Rhizobiales*. Na classe *Gammaproteobacteria* foi identificada uma única ordem, *Xanthomonadales*. Nas classes *Sphingobacteria*, *Flavobacteria*, *Spartobacteria* e *Fusobacteria* foram identificadas as ordens *Sphingobacteriales*, *Flavobacteriales*, *Spartobacteriales* e *Fusobacteriales*, respectivamente. Embora na classe

Actinobacteria também tenha sido observada apenas uma ordem (*Actinomycetales*), esta apresentou mais expressividade em relação às demais (Figura 4).

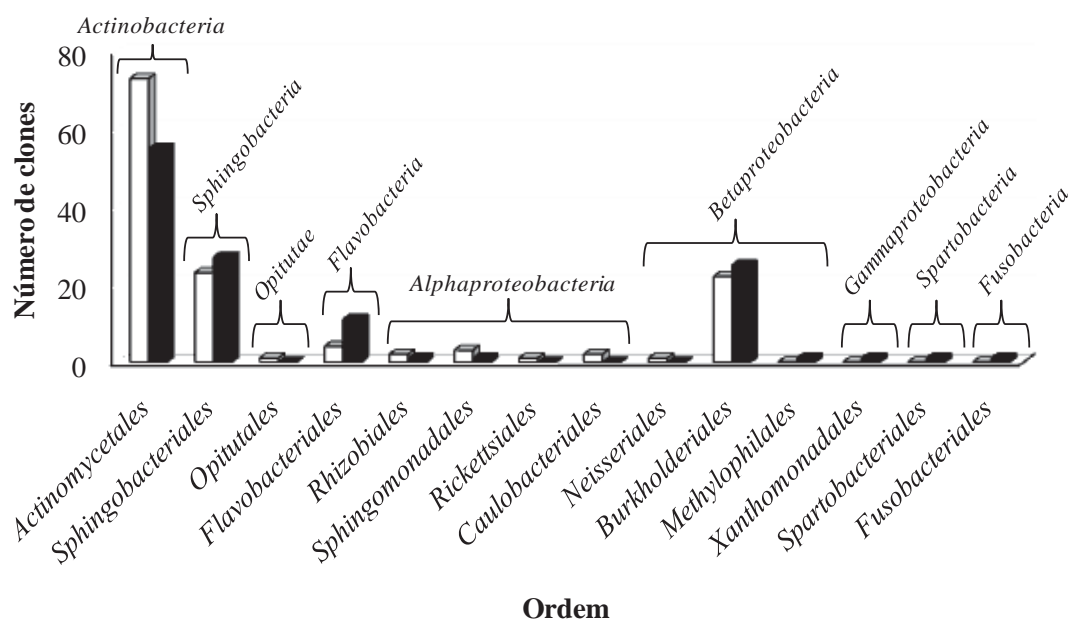


Figura 4. Número de clones representativo de cada ordem na WTI (□) e WTF (■).

A Figura 5 corresponde à análise amostral gerada pelo programa DOTUR (Schloss & Handelsman, 2005) das duas bibliotecas (WTI e WTF). O gráfico mostra uma ascensão contínua da curva de rarefação, passando das 70 unidades taxonômicas operacionais (OTUs).

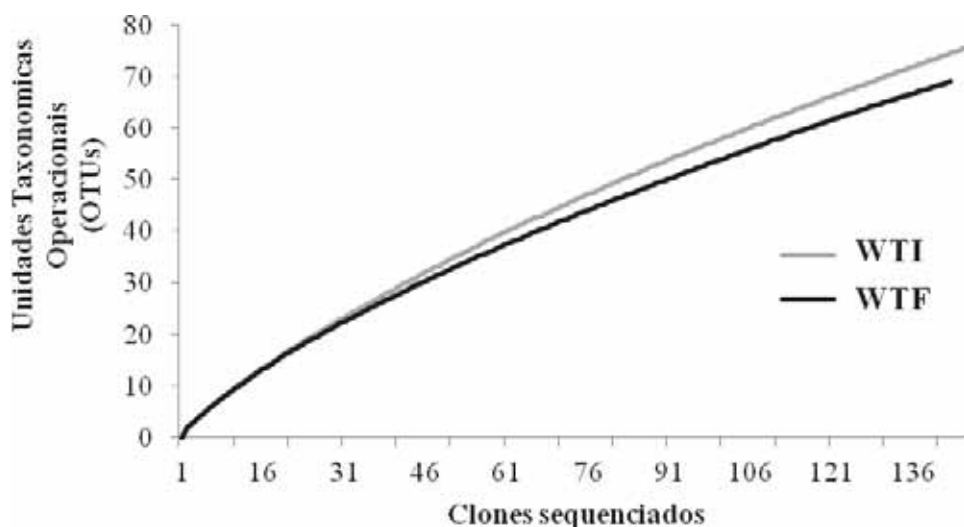


Figura 5. Curva de rarefação da WTI e WTF. O critério de agrupamento das sequencias de 16S rDNA utilizado para a organização das curvas de rarefação foi de 97% de similaridade.

O número de fragmentos de 16S rDNA analisados para a elaboração das curvas de rarefação foi semelhante para as duas bibliotecas de 16S rDNA.

4. DISCUSSÃO

O uso de marcadores moleculares como o *gene 16S rRNA* é uma ferramenta eficaz na identificação de comunidades bacterianas, cultiváveis ou não, encontradas em ambientes terrestres (Kuske et al., 1997; Pereira et al., 2006; Val-Moraes et al., 2009), aquáticos (Ibekwe et al., 2007; Baik et al., 2008; Calheiros et al., 2009) ou em consórcios microbianos (Paixão et al., 2010).

O número de clones identificados em cada classe no início e final do experimento foi semelhante, exceto para as classes *Flavobacteria*, *Actinobacteria* e *ODI*. O número de filós identificados foi maior no final (6 filós) do experimento em comparação ao inicial (4 filós). Quando comparado com lagos naturais o número de filós identificados na *wetland* construída para o tratamento do efluente de reprodutores de *M. rosenbergii* foi maior que o observado por Borsodi et al. (2007) em lagos ácidos na Hungria e por Joshi et al. (2008) em lagos alcalinos na Índia. Esses autores identificaram três filós *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Firmicutes*. Esses filós ocorrem com elevada frequência em lagos de água doce e marinha (Zwart et al., 2002; Eiler & Bertilsson, 2004). O filo *Firmicutes* compreende as bactérias que utilizam o sulfato (SO_4^{2-}) como agente oxidante e são encontradas em ecossistemas aquáticos de água doce (Hongchen et al., 2007). Em *wetlands* situadas em regiões agrícola no leste de Calcutta, na Índia, Ghosh et al. (2007) também identificaram os filós *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. Os filós *Firmicutes* e *Bacteroidetes* são frequentes em sedimentos de lagos de água doce que apresentam gradiente de salinidade ao longo do perfil do sedimento. Nas camadas mais profundas são encontradas bactéria pertencentes ao filo *Firmicutes* e na camada superior (com deposição de sais) bactérias do filo *Bacteroidetes* (Hongchen et al., 2007). Espécies pertencentes ao filo *Bacteroidetes* também foram encontradas associadas à *blooms* de cianobactérias (filo *Cyanobacteria*) em 4 lagos na Suécia (Kirchman, 2001; Eiler & Bertilsson, 2004). O maior número de clones pertencentes à classe *Flavobacteria* no final do experimento em comparação ao inicial pode estar relacionado ao incremento da quantidade matéria orgânica. O crescimento bacteriano possui uma relação com a quantidade de matéria orgânica disponível (Eiler & Bertilsson, 2007). Esses autores avaliaram a dinâmica de *Flavobacteria* em lagos eutrofizados e constataram que a maior abundância das bactérias ocorreu após a senescência e o declínio da população de cianobactérias.

Em *wetland* construída, bactérias da classe *Alphaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*) foram associadas, com 97% de similaridade, à *Agrobacterium vitis* (*Rhizobium vitis*), que é responsável pela fixação de nitrogênio em ambientes terrestres (Ibekwe et al., 2007). Em nosso estudo a classe *Betaproteobacteria* foi a mais abundante do filo *Proteobacteria*, corroborando os trabalhos de Glöckner et al. (1999), Brummet et al. (2003) e Ibekwe et al. (2007). A classe *Betaproteobacteria* está associada à sucessão dos microrganismos no perifíton (Davey & O'Toole, 2000; Jackson et al., 2001), à uma fonte de amônia oxidável (Araya et al., 2003) e à degradação da matéria orgânica (Kirchman, 2001), que é fundamental na otimização da eficiência da *wetland* (Ibekwe et al., 2007).

Os filios *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* também foram identificados por Wu et al. (2007) em um lago (*Lake Taihu*) eutrofizado no leste da China. Assim como em nosso estudo, Wu et al. (2007) observaram que o filo com maior representatividade foi o *Actinobacteria* (26,1%), seguido por *Betaproteobacteria* (23,9%), *Alphaproteobacteria* (14,1%), *Bacteroidetes* (14,1%), *Deltaproteobacteria* (5,6%) e *Gamaproteobacteria* (4,2%). *Actinobacteria* provavelmente é um dos mais abundantes grupos de bacterioplâncton de água doce (Sekar et al., 2003). Este filo é encontrado desde ambientes oligotróficos até hipereutróficos, embora pouco se conheça sobre seu papel em ecossistemas aquáticos (Warnecke et al., 2004). A maior expressividade desse filo em relação aos demais, provavelmente está relacionada à capacidade das bactérias resistirem às variações dos fatores ambientais. Bollmann et al. (2010) relataram que bactérias pertencentes ao filo *Actinobacteria* são capazes de crescer em ambientes com baixos valores de pH e elevadas concentrações de metais pesados, nitrato e matéria orgânica. Além disso, são resistentes a predação por outros microrganismos (Hahn et al., 2003).

A distribuição das comunidades bacterianas em ambientes naturais ou construídos (como as *wetlands* construídas) está diretamente relacionada aos fatores abióticos como, temperatura, salinidade, características do sedimento, matéria orgânica, rede alimentar, distribuição das comunidades fitoplânctônica e zooplânctônica e estado trófico do ambiente aquático (Fandino et al., 2001). A quantidade de matéria orgânica no solo e/ou ambiente aquático influenciam fortemente a abundância e a diversidade da comunidade bacteriana (Grayston et al., 2001). Jaspers et al. (2001) observaram rápidas alterações das comunidades bacterianas antes e depois de *blooms* de fitoplâncton em um lago eutrofizado. Embora alguns autores relataram que as macrófitas aquáticas em *wetlands* possuem pouco efeito sobre a comunidade bacteriana (Ahn et al., 2007; Baptista et al., 2008; Iasur-Kruh et al., 2009), a riqueza e a população de bactérias podem ser influenciadas pela vegetação predominante no

sistema (Stottmeister et al., 2003; Liu et al., 2007; Zhao et al., 2010). Gagnon et al. (2007) reportaram intensa atividade oxidativa aeróbia na superfície das raízes de macrófitas em *wetlands*, sugerindo que a liberação de oxigênio próximo às raízes das plantas influenciam a população de bactéria. Os autores demonstraram que a densidade e atividade bacteriana em *wetlands* estão relacionadas à presença e às espécies de macrófitas utilizadas no sistema. Este fato sugere que macrófitas aquáticas flutuantes podem favorecer a colonização e o predomínio de bactérias aeróbias devido à maior oxigenação das raízes das plantas. A diversidade bacteriana na água, sedimento e rizosfera foi consideravelmente maior em *wetland* com 50% de cobertura vegetal do que *wetland* com 100% da área coberta por macrófitas (Ibekwe et al., 2007). Esses autores relataram que a cobertura de 50% da área da *wetland* favorece as trocas gasosas na interface água ar permitindo a formação de um ambiente favorável à colonização de determinadas bactérias.

Os filos identificados em nossa *wetland* também foram encontrados em solos coletados na região Amazônica (Borneman et al., 1997), em solos de diferentes regiões dos EUA (Rondon et al., 2000; Furlong et al., 2002), na Austrália (Holmes et al., 2000), Escócia (McCaig et al., 1999), Alemanha (Nogales et al., 2001), fontes termais na Islândia (Marteinsson et al., 2001) e sedimentos na China (Cho & Kim, 2000). No Brasil, os filos *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Verrucomicrobia* foram identificados em solos utilizados para agricultura (tomates, feijão, milho e soja) (Pereira et al., 2006) e solos de floresta nativa e plantados com eucalipto (*Eucaliptus* sp) (Silveira et al., 2006). Bactérias isoladas de raízes e amostras de substrato em *wetland* construída para o tratamento de efluente industrial foram correlacionadas à espécies isoladas de sedimentos, areia, plantas, raízes e biofiltros (Calheiros et al., 2009). Esses autores associaram as bactérias isoladas aos táxons *Gamaproteobacteria*, *Firmicutes*, *Alphaproteobacteria*, *Sphingobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*. Elevada densidade de bactérias pertencentes aos filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* e *Actinobacteria* foram identificadas por Lefebvre et al. (2006) em águas residuárias hipersalinas provenientes de curtumes. Esses resultados sugerem que esses filos são formados por bactérias que possuem característica cosmopolita.

O filo *Verrucomicrobia* foi observado com maior expressividade no início do experimento, representado pela classe *Opitutae*. No final, o filo *Verrucomicrobia* foi representado apenas por 1 clone, pertencente à classe *Spartobacteria*. *Verrucomicrobia* é um filo identificado recentemente (Hedlund et al., 1997) que pode ser encontrado em ecossistemas aquáticos e terrestres (Wagner & Horn, 2006). *Opitutus* spp. foi isolado de sistemas alagados de cultivo de arroz (Chin et al., 2002). Embora pouco se conheça sobre sua

função, alguns autores relataram que *Opitutus* favorece o crescimento das plantas por meio de processos fermentativos anaeróbios (obrigatoriamente) tendo como principal produto final o acetato. Nesse processo o N-NO₃ pode ser reduzido à N-NO₂ (Chin et al., 2001; Chin & Janssen, 2002). Dessa forma é possível que a presença de *Opitutus* em *wetlands* construídas para o tratamento do efluente de aquicultura, também, favoreça o crescimento das macrófitas com conseqüente redução da concentração de N.

A *wetland* construída para o tratamento do efluente do viveiro de reprodutores de *M. rosenbergii* apresentou valor do índice de diversidade Shannon-Weaver maior no final do experimento (WTF $H' = 3,73$) do que no início (WTI com $H' = 3,60$). Este resultado pode estar relacionado à maior diversidade de filos observados na última coleta. Em *wetlands* construídas o acúmulo de matéria orgânica com o decorrer do tempo pode levar à colonização de diferentes linhagens de bactérias e, assim, aumentar a diversidade do sistema. Valor do índice de Shannon inferior ao nosso foi observado por Calheiros et al. (2009) em *wetlands* construídas para o tratamento de efluente industrial ($H' = 1,26$). Provavelmente, efluentes provenientes de fontes industriais apresentam características que limitam a diversidade dos sistemas de tratamento.

Ibekwe et al. (2007) comparou a diversidade bacteriana na água, sedimento e rizosfera de *wetland* construída para reduzir a concentração de N-NO₃ do rio que abastece um reservatório subterrâneo por seis meses. Os autores comparam *wetlands* com 50 e 100% de cobertura vegetal e relataram índices de diversidade superiores na *wetland* com área coberta por 50% de macrófitas. Na água, no sedimento e na rizosfera da *wetland* com 50% de cobertura os índices de Shannon-Weaver foram, respectivamente, 0,91; 1,09 e 1,21, enquanto na *wetland* com 100% de cobertura os índices foram 0,74; 1,06 e 0,96, na água, sedimento e na rizosfera, respectivamente. Ibekwe et al. (2007), também avaliaram a diversidade desses sistemas em diferentes períodos. Os autores relataram que a diversidade e a população bacteriana estão relacionadas à presença e quantidade de macrófitas na *wetland*. A presença das plantas pode influenciar a disponibilidade de energia (matéria orgânica) para a colonização e crescimento de comunidades bacterianas específicas.

Os resultados deste trabalho mostram que *wetland* construída para o tratamento de efluente de viveiro de manutenção de reprodutores de *M. rosenbergii* durante 12 semanas apresenta maior diversidade de filos no final do tratamento. Os filos identificados em nossa *wetland*, também, já foram identificados em outros ambientes, como solos, lagos, *wetlands* natural e construída. As curvas de rarefação não atingiram a estabilidade das diferentes sequências de 16S rDNA avaliadas, porém o valor do índice de diversidade Shannon-Weaver

foi mais elevado no final do experimento indicando que há diferença da diversidade entre os dois períodos de amostragem.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn C., Gillevet P.M. & Sikaroodi M. 2007. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading. *Ecological Indicators*, 7, 852-863.
- Allen J.G., Beutel M.W., Call D.R. & Fischer A.M. 2010. Effects of oxygenation on ammonia oxidation potential and microbial diversity in sediment from surface-flow wetland mesocosm. *Bioresource technology*, Essex, 101, 1389-1392.
- Araya R., Tani K., Takagi T., Yamaguchi N. & Nasu M. 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology and Ecology*, Amsterdam, 43, 111-119.
- Babatunde A.O., Zhao Y.Q., Burke A.M., Morris M.A. & Hanrahan J.P. 2009. Characterization of aluminium-based water treatment residual for potential phosphorus removal in engineered wetlands. *Environmental Pollution*, Barking, 157, 2830-2836.
- Baik K.S., Park S.C., Kim E.M., Bae K.S., Ahn Jae-Hyung., Ka Jong OK., Chun J & Seong C.N. 2008. Diversity of bacterial community in freshwater of Woopo wetland. *The Journal of Microbiology*, Korea, 46, 647-655.
- Baptista J.C., Davenport R.J., Donnelly T. & Curtis T.P. 2008. The microbial diversity of laboratory-scale wetlands appears to be randomly assembled. *Water Research*, New York, 42, 3182-3190.
- Bollmann A., Palumbo A.V., Lewis K., Epstein S.S. 2010. Isolation and physiology of bacteria from contaminated subsurface sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 76, 7413-7419.
- Borneman J. & Triplett W. 1997. Molecular microbial diversity in soil from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganism and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 2647-2653.

- Borsodi A.K., Vladár P., Reskóné M.N., Sipos R., Gedeon G. & Márialigeti K. 2007. Metabolic activity and phylogenetic diversity of reed (*Phragmites australis*) periphyton bacterial communities in a hungarian shallow soda lake. *Microbial Ecology*, New York, 4, 612-620.
- Brummet I.H.M., Felske A. & Wagner-Dobler I. 2003. Diversity and seasonal variability of β -proteobacteria in biofilms of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 69, 4463–4473.
- Calheiros C.S.C., Duque A.F., Moura A., Henriques I.S., Correia A., Rangel A.O.S.S. & Castro P.M.L. 2009. Substrate effect on bacterial communities from constructed wetlands planted with *Typha latifolia* treating industrial wastewater. *Ecological Engineering*, Oxford, 35, 744-753.
- Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., Mcgarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M. & Tiedje J.M. 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 37,141-145.
- Chin K.J., Liesack W. & Janssen P.H. 2001. *Opiritatus terrae* gen. nov., sp. nov., to accommodate novel strains of the division “Verrucomicrobia” isolated from rice paddy soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 1965–1968.
- Chin K.J. & Janssen P.H. 2002. Propionate formation by *Opiritatus terrae* in pure culture and in mixed culture with a hydrogenotrophic methanogen and implications for carbon fluxes in anoxic rice paddy soil. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 68, 2089–2092.
- Cho, J.C. & Kim S.J. 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 66, 956-965.
- Davey M.E. & O’Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reveiws*, New York, 64, 847–867.
- Eiler A. & Bertilsson S. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish lakes. *Environmental Microbiology*, Oxford, 6, 1228-1243.

- Eiler A. & Bertilsson S. 2007. *Flavobacteria* Blooms in four eutrophic lakes: linking population dynamics of freshwater bacterioplankton to resource availability. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 73, 3511-3518.
- Ewing B. & Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, 8, 186–194.
- Ewing B., Hillier L., Wendl M.C. & Green, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, 8, 175–185.
- Fandino L.B., Riemann L., Steward G.F., Long R.A. & Azam F. 2001. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat Microb Ecol*, 23, 119–130.
- Felsenstein J. 1989. Phylip-Phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*, 5, 164-166.
- Faulwetter J.L., Gagnon V., Sundberg C., Chazarenc F., Burr M.D., Brisson J., Camper A.K. & Stein O.R. 2009. Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: a review. *Ecological Engineering*, Oxford, 35, 987–1004.
- Furlong M.A., Singleton D.R., Coleman D.C. & Whitman W.B. 2002. Molecular and cultured-based analysis of prokaryotic communities from agricultural soil and Burrows and Casts of the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 68, 1265-1279.
- Gagnon V., Chazarenc F., Comeau Y. & Brisson J. 2007. Influence of macrophyte species on microbial density and activity in constructed wetlands. *Water Science and Technology*, London, 56, 249-254.
- Ghosh A., Maity B., Chakrabarti K. & Chattopadhey D. 2007. Bacterial diversity of East Calcutta wetland area: Possible identification of potential bacterial population for different biotechnologies uses. *Microbial Ecology*, Amsterdam, 54, 452-459.
- Glöckner F.O., Fuchs B.M. & Amann R. 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 65, 3721–3726.
- Gordon D., Abajian C. & Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, Cold Spring Harbor, 8, 195-202.
- Greenway M., 2005. The role of constructed wetlands in secondary effluent treatment and reuse in subtropical and arid Australia. *Ecological Engineering*, Oxford, 25, 501–509.

- Grayston J.S., Griffith G.S., Mawdsley J.L., Campbell C.D. & Bardgett R.D. 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 33, 533-551.
- Hahn M.W., Lunsdorf H., Wu Q., Schauer M., Hofle M.G., Boenigk J. & Stadler P. 2003. Isolation of novel ultramicrobacteria classified as Actinobacteria from five freshwater habitats in Europe and Asia. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 69, 1442-1451.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. 166, 557-580.
- Hedlund B.P., Gosink J.J. & Staley J.T. 1997. *Verrucomicrobia* div. nov., a new division of the Bacteria containing three new species of Prosthecobacter. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, 72, 29-38.
- Henry-Silva G.G. & Camargo A.F.M. 2006. Efficiency of aquatic macrophyte to treat Nile tilapia pond effluents. *Scientia Agricola*, Piracicaba, 63, 433-438.
- Henry-Silva G.G. & Camargo A.F.M. 2008. Tratamento de efluentes de carcinicultura por macrófitas aquáticas flutuantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 37, 181-188.
- Hongchen J., Hailiang D., Bingsong Y., Xinqi L., Yiliang L., Shanshan J. & Chuanlun L. Z. 2007. Microbial response to salinity change in Lake Chaka, a hypersaline lake on Tibetan plateau. *Environmental Microbiology*, Oxford, 9, 2603-2621.
- Holmes A.J., Bowyer J., Holley Mp., O'Donoghue M., Montgomery M. & Gillings Mr. 2000. Diverse, yet to be cultured members of the *Rubrobacter* subdivision of the *Actinobacteria* are widespread in Australia arid soils. *FEMS Microbiology and Ecology*, Amsterdam, 33, 111-120.
- Iasur-Kruh L., Hadar Y., Milstein D., Gasith A., Minz D. 2009. Microbial population and activity in wetland microcosm constructed for improving treated municipal wastewater. *Environmental Microbiology*, Oxford, doi: 10.1007/s00248-009-9611-z.
- Ibekwe A.M., Lyon S.R., Leddy M. & Jacobson-Meyers M. 2007. Impact of plant density and microbial composition on water quality from a free water surface constructed wetland. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, 102, 921-936.
- Jackson C.R., Churchill P.F. & Roden E.E. 2001. Successional changes in bacterial assemblage structure during epilithic biofilm development. *Ecology*, Tempe, 82, 555-556.

- Jaspers E., Nauhaus K., Cypionka H. & Overmann J. 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiology and Ecology*, Amsterdam, 36, 153–164.
- Joshi A.A., Kanekar P.P., Kelkar A.S., Shouche Y.S., Vani A.A., Borgave S.B. & Sarnaik S.S. 2008. Cultivable bacterial diversity of alkaline Lonar Lake, India. *Microb. Ecol.*, 55, 163-172.
- Kadlec R.H. & Knight R.L. 1996. *Treatment wetlands*, Boca Raton: CRC Lewis Publishers, 893 p.
- Kadlec R.H., Knight R.L., Vymazal J., Brix H., Cooper P. & Haberl, R. 2000. *Constructed wetlands for pollution control-processes, performance, design and operation*. IWA Scientific and Technical Report No. 8. IWA Publishing. London, UK.
- Kadlec R.H. & Wallace S. 2009. *Treatment Wetlands*. 2^a. ed. Lewis Publishers, Boca Raton, New York, FL.
- Kimura M.A. 1980. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, New York, 16, 111-120.
- Kirchman D.L. 2001. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiology and Ecology*, Amsterdam, 39, 91–100.
- Kumar J.L.G. & Zhao Y.Q. 2011. A review on numerous modeling approaches for effective, economical and ecological treatment wetlands. *Journal of Environmental Management*, London, 92, 400-406.
- Kuske C.R., Barns S.M., Busch J.D. 1997. Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soils of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 63, 3614-3621.
- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt E. & Goodfellow M. (eds). New York, USA: John Wiley & Sons, pp. 115–148.
- Lefebvre O., Vasudevan N., Thanasekaran K., Moletta R. & Godon J.J. 2006. Microbial diversity in hypersaline wastewater: the example of tanneries. *Extremophiles*, Tokyo, 10, 505-13.

- Lin Y.F., Jing S.R., Lee D.Y. & Wang T.W. 2002. Nutrient removal from aquaculture wastewater using a constructed wetlands system. *Aquaculture*, Amsterdam, 209, 169-184.
- Lin Y.F., Jing S.R., Lee, D.Y., Chang, Y.F., Chen, Y.M. & Shih, K.C. 2005. Performance of a constructed wetland treating intensive shrimp aquaculture wastewater under high hydraulic loading rate. *Environmental Pollution*, Barking, 134, 411-421.
- Liu X.C., Zhang Y., Yang M., Wang Z.Y. & Lv W.Z. 2007. Analysis of bacterial community structures in two sewage treatment plants with different sludge properties and treatment performance by nested PCR-DGGE method. *Journal of Environmental Science*, 19-60-66.
- Marteinsson V.T., Hauksdóttir S., Hobel C.F.V., Kristmannsdóttir H., Hreggvidsson G.O. & Kristjánsson J.K. 2001. Phylogenetic diversity analysis subterranean hot spring in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 67, 4242-4248.
- Mccaig A.E., Glover A. & Prosser J.I. 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 65, 1721-30.
- Moriarty D.J.W. 1997. The role of microorganism in aquaculture ponds. *Aquaculture*, Amsterdam, 151, 333-349.
- Naylor S., Brisson J., Labelle M.A., Drizo A. & Comeau Y. 2003. Treatment of freshwater fish farm effluent using constructed wetlands: the role of plants and substrate. *Water Science and Technology*, London, 48, 215-222.
- Nogales B., Moore E.R.B., Llobet-Brossa E., Rossello-Mora R., Amann R. & Timmis K.N. 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to the study the bacterial community of polychlorinated biphenyl-polluted soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 67, 1874-1884.
- Paixão D.A.A., Dimitrov M.R., Pereira R.M., Accorsini F.R., Vidotti M.B. & Lemos, E.G.M. 2010. Molecular analyses of bacterial diversity in a consortium specialized on diesel oil degradation. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, Campinas, 34, 773-781.
- Pereira R.M., Silveira E.L., Scaquitto D.C., Pedrinho E.A.N., Val-moraes S.P., Wickert E., Carareto-Alves L.M., Lemos E.G.M. 2006. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 37, 439-447.

- Pinto F.R., Henares M.N.P., Cruz C. & Amaral L.A. 2009. Remoção de *Escherichia coli* de efluentes de carcinicultura por macrófitas aquáticas flutuantes. *ARS Veterinária*, Jaboticabal, 25, 147-150.
- Rondon M.R., August P.R., Berttermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., Mcneil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M.S., Clardy J., Handelsman J. & Goodman R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 66, 2541-2547.
- Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, 4, 406-425.
- Sambrook J. & Russell D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schloss P.D. & Handelsman J. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 71, 1501-1506.
- Sekar R., Pernthaler A., Pernthaler J., Warnecke F., Posch T. & Amann, R. 2003. An improved protocol for the quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence *in situ* hybridization. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 69, 2928–2935.
- Shannon A.E. & Weaver W. 1963. *The mathematical theory of communication*. Urbana, IL: University Illinois Press.
- Sleytr K., Tietz A., Langergraber G., Haberla R. & Sessitsch A. 2009. Diversity of abundant bacteria in subsurface vertical flow constructed wetlands. *Ecological Engineering*, Oxford, 35, 1021-1025.
- Silveira E.L., Pereira R.M., Scaquitto D.C., Pedrinho E.A.N., Val-moraes S.P., Wickert E., Carareto-Alves L.M. & Lemos E.G.M. 2006. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S rDNA sequencing analysis. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, 41, 1507-1516.
- Stottmeister U., Wiebner A., Kusch P., Kappelmeyer U., Kastner M., Bederski O., Muller R.A. & Moormann H. 2003. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. *Biotechnology Advances*, Oxford, 22, 93-117.

- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, Chicago, 24, 1596-1599.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, Oxford, 25, 4876-4882.
- Vacca G., Wand H., Nikolausz M., Kusch P. & Kästner M. 2005. Effect of plants and filter material on bacteria removal in pilot-scale constructed wetlands. *Water Research*, New York, 39, 1361-1373.
- Val-Moraes S.P., Ghini R., Valarini M.J., Lemos E.G.M. & Carareto-Alves L.M. 2009. Diversidade de bactérias de solo sob vegetação natural e cultivo de hortaliças. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, 40, 7-16.
- Vymazal J. 2009. The use constructed wetlands with horizontal sub-surface flow for various types of wastewater. *Ecological Engineering*, Oxford, 35, 1-17.
- Wagner M. & Horn M. 2006. The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Current Opinion in Biotechnology*, London, 17, 241–249.
- Wang Q., Garrity G.M., Tiedje J.M. & Cole J.R. 2007. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 73, 5261–5267.
- Warnecke F., Amann R. & Pernthaler J. 2004. Actinobacterial 16S rRNA genes from freshwater habitats cluster in four distinct lineages. *Environmental Microbiology*, Oxford, 6, 242–253.
- Wu X., Xi W., Ye W. & Yang H. 2007. Bacterial community composition of shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiology and Ecology*, Amsterdam, 61, 85-96.
- Zhao Y., Liua B., Zhang W., Hud C. & Shuqing A. 2010. Effects of plant and influent C:N:P ratio on microbial diversity in pilot-scale constructed wetlands, *Ecological Engineering*, Oxford, 36, 441-449.

- Zhou Q., He F., Zhang L. Wang Y. & Wu Z. 2009. Characteristics of the microbial communities in the integrated vertical-flow constructed wetlands. *Journal of Environmental Science*, 21, 1261-1267.
- Zwart G., Crump B.C., Kamst-van A.M., Hagen F. & Han S.K. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28,141–155.