

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

DECISÃO DE DIRETORIA 42, DE 23 DE MARÇO DE 2006

Dispõe sobre a homologação da revisão da Norma Técnica L5.303 - Fitoplâncton de Água Doce - Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio) - dez/2005

A Diretoria Plena da CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, à vista de tudo quanto consta do Processo nº GNT/SDEP/0678/77 e considerando o contido no Relatório à Diretoria nº 012/2006/E, que acolhe, decide:

Artigo 1º - Homologar a revisão da Norma Técnica L5.303 - Fitoplâncton de Água Doce - Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio) - jan/2006, constante do anexo único que integra esta Decisão de Diretoria.

Artigo 2º - Esta Decisão de Diretoria entra em vigor na data de sua publicação.

FITOPLÂNCTON DE ÁGUA DOCE. MÉTODOS QUALITATIVO E QUANTITATIVO Método de Ensaio

L5.303

DEZ/2005

Sumário

Introdução

1. Objetivos
2. Documentos Complementares
3. Definições
4. Equipamentos e Reagentes
5. Execução do Ensaio
6. Expressão dos Resultados
7. Controle Laboratorial e Estocagem
8. Equipamentos de Coleta e Análise do Fitoplâncton de Água Doce
9. Modelo de Ficha de Análise do Fitoplâncton de Água Doce
10. Exemplo de Boletim Técnico
11. Referências Bibliográficas

Introdução

Fitoplâncton é a comunidade de organismos microscópicos fotossintetizantes que flutuam livremente nas diversas camadas dos corpos d'água e que é constituída principalmente por algas: clorofíceas, diatomáceas, euglenofíceas, crisofíceas, dinofíceas, xantofíceas e também cianobactérias (cianofíceas).

Algas são organismos vegetais unicelulares ou multicelulares que fazem parte da comunidade produtora primária de um ecossistema aquático, podendo constituir a base da cadeia alimentar desse ambiente. Utilizando a energia solar, transformam nutrientes minerais em matéria orgânica, fenômeno conhecido como fotossíntese.

Em geral, águas limpas e pobres em nutrientes apresentam uma comunidade fitoplanctônica pouco abundante, com alta diversidade, enquanto que águas ricas em nutrientes apresentam grande número de organismos, pertencentes a poucas espécies.

Além da quantidade de nutrientes da água, outros fatores influenciam a composição e distribuição espacial e temporal da comunidade fitoplanctônica, tais como: correntes, estratificação térmica, circulação, hora do dia, profundidade de penetração da luz, intensidade luminosa, temperatura e presença de substâncias tóxicas.

Em mananciais que recebem despejos domésticos, industriais ou de fontes agrícolas difusas, ocorrem altas concentrações de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio. Este fenômeno de desequilíbrio ecológico, conhecido como eutrofização ou enriquecimento das águas, favorece a proliferação rápida de algas e cianobactérias, fato que pode acarretar vários problemas no ambiente aquático, tais como: flutuações extremas da concentração de oxigênio dissolvido e pH; dificuldade de penetração de luz na coluna d'água pelo acúmulo de algas na superfície, prejudicando o desenvolvimento de outras formas de vida; mudanças de coloração; presença de odores e sabores desagradáveis e toxicidade à água. Estas situações são indesejáveis, principalmente em mananciais utilizados para abastecimento público e recreação, pois dificultam e oneram o processo de tratamento de água.

Alguns organismos fitoplanctônicos, principalmente do grupo das diatomáceas, podem provocar entupimento de filtros com conseqüentes problemas em estações de tratamento.

Certas espécies de algas podem ainda, contribuir para acelerar a corrosão de concreto submerso, estruturas de metal, tanto diretamente nos locais onde crescem aderidas, quanto por alterações físicas e/ou químicas da água.

O exame dos componentes do fitoplâncton, sua identificação e quantificação são de grande interesse para avaliar as condições ecológicas de um ecossistema aquático, prevenir ou controlar situações indesejáveis ou incompatíveis com a finalidade de utilização de um determinado manancial e, inclusive, para o desenvolvimento de culturas de interesse econômico, como a piscicultura.

O grupo das cianofíceas ou cianobactérias é o mais problemático do ponto de vista sanitário. São organismos procariotos, ou seja, com características de bactérias, porém com um sistema fotossintetizante semelhante ao das algas (vegetais), daí a dupla denominação.

Este grupo tem capacidade de crescimento nos mais diversos ambientes, porém ocorre preferencialmente em pH variando entre 6,0 e 9,0, temperatura entre 15 - 30°C e alta concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo.

Todas as cianobactérias são consideradas potencialmente tóxicas, embora algumas espécies ainda não tenham toxicidade comprovada. Existem relatos na literatura de casos de intoxicação, inclusive para o homem, causados pela ingestão de águas contendo algas tóxicas e/ou toxinas liberadas pelas suas florações. As toxinas de cianobactérias são conhecidas como cianotoxinas, que por seu efeito podem ser classificadas como neuro ou hepatotóxicas.

Os gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis* são produtores potenciais de neurotoxinas, que podem causar insuficiência respiratória e levar à morte de animais entre 2 e 30 minutos.

As hepatotoxinas apresentam uma ação mais lenta, causando o tipo mais comum de intoxicação e provocando hepatoenterites. Alguns gêneros produtores dessas toxinas são *Microcystis*, *Anabaena*, *Planktothrix*, *Oscillatoria*, *Radiocystis* e *Cylindrospermopsis*. Além do efeito agudo essas toxinas também podem causar efeitos crônicos como por exemplo, o desenvolvimento de tumores.

O controle das cianobactérias em mananciais de abastecimento é importante devido ao seu potencial tóxico. A Portaria nº 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), relativa às Normas de Qualidade para Água de Consumo Humano (Potabilidade), estabelece que os responsáveis por estações de tratamento de água para abastecimento público devem realizar monitoramento de cianobactérias e controle de cianotoxinas nos mananciais. Também a Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005) contempla o monitoramento destes organismos.

Objetivos

Esta Norma descreve os principais métodos qualitativos e quantitativos de preservação, concentração e contagem de organismos do fitoplâncton de água doce.

Os estudos de fitoplâncton de água doce têm por finalidade:

- a) Avaliar a estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos;
- b) Subsidiar ações de controle nas estações de tratamento de água para abastecimento público em relação a alterações de cor, turbidez, odores indesejáveis, partículas visíveis na água, obstrução de filtros e aplicação de algicidas. Determinar a eficiência de vários estágios do tratamento e auxiliar na determinação da dosagem de cloro a ser adicionada à água;
- c) Identificar a origem de uma fonte ou efluente misturado na água;

- d) Subsidiar a interpretação de análises químicas, por exemplo, correlacionando a presença ou ausência de certas espécies com a deficiência ou excesso de determinados elementos no ambiente aquático;
- e) Detectar a presença de espécies potencialmente tóxicas em águas de abastecimento ou recreacionais, que possam causar impacto na saúde humana, e fornecer subsídios para a tomada de decisões em programas de monitoramento e gerenciamento de reservatórios para minimizar seus impactos;
- f) Indicar a natureza, extensão e efeitos biológicos da poluição;
- g) Detectar e acompanhar o processo de autodepuração em corpos d'água e o desenvolvimento e sucessão de formas fitoplanctônicas em processos de tratamento de esgotos domésticos de lagoas de estabilização;
- h) Explicar os mecanismos de ação dos fatores biológicos de águas residuais ou avaliar sua efetividade;
- i) Documentar a curto e longo prazo a variabilidade na qualidade da água, como consequência de mudanças naturais e/ou provocadas pelo homem, especialmente por despejos ricos em nutrientes ou contaminados por metais;
- j) Fornecer dados sobre o estado trófico de ecossistemas aquáticos;
- k) Acompanhar o desenvolvimento de culturas ou bioensaios com algas; e
- l) Avaliar a eficiência de ações de manejo para melhoria e recuperação de corpos d'água.

Documentos Complementares

- Norma Técnica CETESB L5.313 - Coleta de fitoplâncton marinho e de água doce: procedimento, (CETESB, 1991);
- Guia de coleta e preservação de amostras de água. AGUDO, E. G. (Coord.). São Paulo: CETESB, 1988;
- Portaria nº 518 de 03/2004. Ministério da Saúde. BRASIL. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270;
- Resolução CONAMA nº 357 de 03/2005. Ministério do Meio Ambiente. BRASIL. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63;
- Trabalhos técnicos sobre identificação do fitoplâncton de água doce (item 11.1).

Definições

3.1 - Autótrofo

Ser vivo capaz de produzir seu próprio alimento ou matéria orgânica, a partir de material inorgânico e energia luminosa ou química.

3.2 - Biomassa

Quantidade de material vivo que pode ser expressa em peso, volume ou área.

3.3 - Cianotoxinas

Toxinas produzidas por cianobactérias que causam efeitos adversos à saúde do homem e de alguns animais.

3.4 - Ecossistema

Unidade de natureza ativa que combina comunidades bióticas e fatores abióticos com os quais interagem. Os ecossistemas apresentam grande variabilidade em relação às suas dimensões e características.

3.5 - Eutrofização

Aumento da concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, tendo como consequência o aumento da produtividade do ambiente aquático.

3.6 - Fitoplâncton

Comunidade vegetal microscópica que vive em suspensão nas diversas camadas de água onde, graças à presença de energia luminosa, promove o processo fotossintético, principal responsável pela base da cadeia alimentar no meio aquático.

3.7 - Floração

Crescimento intenso de algas potencialmente tóxicas ou não, geralmente causado por aumento de nutrientes, como nitratos e fosfatos. Essas altas densidades de organismos podem ocorrer em curtos períodos e durante todo o ano.

3.7.1 - Florações Tóxicas ou Florações de Algas Nocivas (FAN)

Causam riscos para o abastecimento público ou balneabilidade. Esses florescimentos também podem matar os peixes e tornar os moluscos tóxicos ao consumo humano, além de causar morte em animais que utilizam esta água para dessedentação.

3.8 - Frústula

Parede celular dura, silicosa, das diatomáceas, constituída por duas partes que se assemelham às partes superior e inferior de uma caixa perfeitamente ajustada. Essas partes são chamadas de valvas ou epiteca e hipoteca.

3.9 - Fotossíntese

Processo de conversão de dióxido de carbono para carbono orgânico (carboidrato) que ocorre ao nível dos cloroplastos, pela ação da energia luminosa absorvida pelos pigmentos fotossintetizantes, especialmente clorofila.

3.10 - Heterótrofo

Organismo que não produz seu próprio alimento e retira sua nutrição consumindo as complexas moléculas orgânicas produzidas por plantas ou presentes em outros organismos, vivos ou em decomposição.

3.11 - UPA (Unidade Padrão de Área)

Unidade Padrão de Área, aceita internacionalmente para quantificar o plâncton em águas de abastecimento, com valor de $400\mu\text{m}^2$.

Equipamentos e Reagentes

4.1 - Equipamentos para amostragem:

4.1.1 - Garrafa de van Dorn (figura 1)

4.1.2 - Rede de plâncton (figura 2)

Observação: descrições e informações sobre aparelhos de amostragem podem ser encontrados na Norma Técnica CETESB L5.313 (CETESB, 1991) e em Agudo (1988).

4.2 - Reagentes:

4.2.1 - Formalina - Formaldeído 40% neutralizado com tetraborato de sódio (20g/L) ou bicarbonato de sódio (5g/L), chegando a uma concentração final na amostra de 2%;

4.2.2 - Detergente comercial neutro transparente;

4.2.3 - Solução Transeau: 6 partes de água, 3 partes de álcool etílico 95°GL e 1 parte de formalina;

4.2.4 - Glutaraldeído neutralizado com tetraborato de sódio (20g/L) ou bicarbonato de sódio (5g/L), em concentração final de 1 a 2%;

4.2.5 - Solução de lugol: dissolver 10g de iodo puro, 20g de iodeto de potássio, 20mL de ácido acético glacial em 200mL de água destilada. Esta solução deve ser armazenada em frasco escuro. Recomenda-se de 0,3 a 1,0 mL/100mL dependendo da concentração de organismos;

4.2.6 - Hidróxido de Potássio 0,03M: dissolver 168g de Hidróxido de Potássio em 1 litro de água destilada;

4.2.7 - Tinta nanquim.

4.3 - Equipamentos e Instrumentos para execução da análise:

4.3.1 - Centrífuga;

4.3.2 - Balança com precisão de 0,1g;

4.3.3 - Provetas graduadas;

4.3.4 - Pipetas graduadas;

4.3.5 - Contador manual de uma ou de várias teclas;

4.3.6 - Retículo de Whipple (Figura 3);

4.3.7 - Microscópio binocular comum, com ocular de aumento de 10 ou 12,5X e objetivas com aumento de 10, 20, 40, 63 e 100X, retículo de Whipple calibrado. Contraste de fase e epifluorescência são recomendados para auxiliar na análise;

4.3.8 - Microscópio invertido (invertoscópio), com ocular de aumento de 10X ou 12,5X e objetivas com aumento de 10, 20, e 40X (63X e 100X são opcionais), retículo de Whipple calibrado. Contraste de fase e epifluorescência são recomendados para auxiliar na análise;

4.3.9 - Câmaras de Utermöhl (também chamadas de câmaras de invertoscópio), com capacidade de 2, 5, 10, 25, 50 ou 100mL (Figura 4);

4.3.10 - Câmaras de Sedgwick-Rafter com capacidade de 1mL (S-R). Estas câmaras apresentam 20mm de largura por 50mm de comprimento e 1mm de profundidade (Figura 5);

4.3.11 - Lâmina micrométrica;

4.3.12 - Lâminas e lamínulas comuns;

4.3.13 - Pipetas Pasteur;

4.3.14 - Câmara úmida: recipiente fechado, umidificado, utilizado para manter a umidade das câmaras.

Execução do Ensaio

5.1 - Princípio do método

O método a ser utilizado para análise do fitoplâncton de água doce depende do objetivo que se pretende alcançar. Algumas análises têm o objetivo de determinar a composição da comunidade fitoplanctônica e avaliar suas concentrações relativas. Em outros casos, é suficiente a identificação da espécie dominante que pode estar causando problemas, como por exemplo produção de sabor e/ou odor desagradáveis ou obstrução de filtros. Nestas situações, uma avaliação qualitativa é suficiente.

Em estudos de monitoramento, diagnóstico ou ecológicos, quando se deseja comparar locais ou diferentes épocas do ano, é importante uma análise quantitativa.

Informações sobre a temperatura da água, turbidez, pH, oxigênio dissolvido e nutrientes são valiosas e podem facilitar a interpretação dos resultados sobre a comunidade fitoplanctônica propriamente dita.

5.2 - Procedimento

5.2.1 - Preservação da amostra

Para análise quantitativa é necessário que a amostra seja preservada.

A amostra poderá ser preservada com formalina, lugol, solução transeau ou glutaraldeído. Para a identificação de determinados grupos de cianobactérias e flagelados, é necessária a observação do material antes da preservação, para verificação de movimento e de estruturas só visíveis no organismo vivo. Havendo necessidade de observação dos organismos vivos, a amostra deve ser resfriada no transporte do local de coleta ao laboratório.

No quadro abaixo estão discriminadas as vantagens e desvantagens de cada conservante.

TIPO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
LUGOL	Preservação de flagelos e aumento do peso específico das células, facilitando a sedimentação.	Dissolve frústulas de diatomáceas mais delicadas e escamas de silicoflagelados.
FORMOL	Pode ser estocado por vários anos e não muda a coloração das algas.	Distorce a forma da célula de flagelados nus, provoca perda de flagelos, toxicidade à saúde humana.
TRANSEAU	Mantém as características das células como flagelos e plastos.	Grande volume utilizado.
GLUTARALDEÍDO	Não provoca alterações nas células	É altamente tóxico.

	e pode ser utilizado em epifluorescência.	
--	---	--

5.2.2 - Cuidados na preparação da amostra

Para a preparação da amostra é necessário que se realizem os seguintes procedimentos:

5.2.2.1 - Deixar a amostra em temperatura ambiente. Se a amostra estiver refrigerada e for colocada diretamente nas câmaras de contagem (Sedgwick-Rafter e Utermöhl), bolhas de ar irão se desenvolver prejudicando a sedimentação.

5.2.2.2 - Homogeneizar a amostra várias vezes para promover a distribuição uniforme.

5.2.2.3 - O local para a preparação e sedimentação dos organismos, nas câmaras de contagem, deverá apresentar superfície plana e estar abrigado de luz e movimentos.

Com a finalidade de realizar a avaliação quantitativa, a análise de amostras de fitoplâncton de água doce requer com grande frequência, que os organismos nelas presentes sejam concentrados. Várias técnicas de concentração foram desenvolvidas, todas elas apresentando vantagens e desvantagens, e cada qual deve ser aplicada de acordo com o objetivo do estudo. Os métodos de concentração mais utilizados são o de centrifugação e o de sedimentação.

É importante considerar que para cada etapa deste procedimento, fatores de conversão deverão ser calculados.

5.2.3 - Concentração das amostras por centrifugação

Este método dá uma resposta mais rápida porém pode causar perda de organismos, alteração de seu aspecto e rompimento de células. O volume a ser centrifugado irá depender da concentração das algas na amostra; se a concentração final para a análise for muito elevada, a contagem será mais trabalhosa e demorada.

Se em função da capacidade da centrífuga, houver necessidade de dividir a amostra em dois volumes, procede-se da seguinte forma: para 100mL, por exemplo, após a centrifugação de cada um dos dois tubos de 50mL referentes à mesma amostra, são desprezados 45mL do sobrenadante. Homogeneizam-se os 5mL restantes de um dos tubos e verte-se ao outro, obtendo-se desta forma, 10mL de amostra concentrada 10 vezes. As amostras devem ser centrifugadas a 2500 rpm durante 20 minutos.

A análise do material centrifugado pode ser feita em câmaras de Sedgwick-Rafter ou, utilizando-se uma micropipeta e adicionando uma gota de volume definido, em lâmina normal de microscópio com lamínula selada. Este último método é recomendado apenas na ausência dos demais, uma vez que devido ao pequeno volume utilizado pode ocorrer perda de material.

Observação 1: Para amostras provenientes de ambientes que apresentam grande quantidade de algas, como por exemplo lagoas de estabilização, não é necessário que se concentre o material.

Observação 2: Para rios ou corpos d'água que apresentem muito material em suspensão é necessário diluir a amostra e, se a concentração fitoplanctônica for baixa, analisar várias subamostras e proceder aos cálculos correspondentes.

5.2.4 - Concentração das amostras por sedimentação

Outro método de concentração de amostra é o de sedimentação de organismos em câmaras de Utermöhl, nas quais a amostra preservada é colocada e levada a uma câmara úmida, onde permanece durante 12 horas ou mais. Alguns autores recomendam 2 horas de repouso da amostra para cada centímetro da coluna, enquanto outros sugerem de 3 a 4 horas por centímetro.

Quando a amostra estiver preservada com formalina, o tempo necessário para sedimentação será o dobro.

Dependendo da quantidade de algas presentes na amostra, utilizam-se câmaras de volumes diferentes, sendo as mais comumente empregadas de 2,5 a 10mL (Figura 4) podendo variar até 50 ou 100mL.

Para a preparação de uma câmara de Utermöhl deve-se proceder da seguinte forma:

5.2.4.1 - Colocar a câmara em posição plana e horizontal;

5.2.4.2 - Homogeneizar a amostra preservada e retirar, com auxílio de uma pipeta, uma subamostra em quantidade suficiente para preencher o volume da câmara de Utermöhl;

5.2.4.3 - Com a lâmina de vidro espesso, recobrir cuidadosamente a câmara, evitando a formação de bolhas;

5.2.4.4 - Levar a subamostra preparada a uma câmara úmida onde deve permanecer durante o tempo necessário para sedimentação dos organismos.

Se não houver disponibilidade de um microscópio invertido ou centrífuga, também é possível sedimentar a amostra em proveta e desprezar o sobrenadante.

Observação 3: *Todo o material utilizado, principalmente as câmaras de Sedgwick-Rafter e Utermöhl deve estar limpo, isento de poeira ou gordura.*

5.2.5 - Procedimento de análise

Dependendo da quantidade de organismos, a subamostra será analisada integralmente ou parcialmente, por meio da contagem de transectos ou campos aleatórios, com o auxílio do retículo de Whipple calibrado. Para auxiliar na visualização de estruturas hialinas, como flagelos por exemplo, pode ser utilizado o contraste de fase e para distinguir as cianofíceas de pequenas dimensões de bactérias que não devem ser quantificadas na amostra, pode-se usar epifluorescência. O uso de nanquim para visualização de bainhas, principalmente para as cianofíceas, também é recomendado.

5.2.6 - Calibração do retículo de Whipple

O microscópio binocular comum e o invertoscópio, ao serem utilizados para contagem de microrganismos, devem estar equipados com retículo de Whipple na ocular. O microscópio deverá ser previamente calibrado, com o auxílio de um micrômetro (régua milimétrica), para a objetiva e a ocular que serão utilizadas durante o exame. Para se realizar a calibração, o micrômetro é colocado na platina do microscópio e superposto a um dos lados do retículo de Whipple. Procura-se um ponto de correspondência entre as graduações do retículo e do micrômetro, a fim de que seja medido o lado do retículo. Encontrado o ponto de correspondência, pode-se calcular o valor da menor divisão do retículo e a área do mesmo.

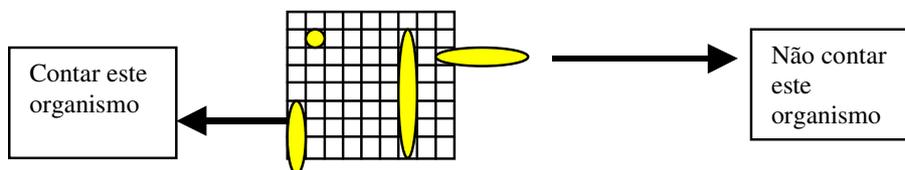
Exemplo: Em um microscópio binocular comum, usando-se objetiva com aumento de 20X e ocular com aumento de 10X, superpondo-se o retículo de Whipple e o micrômetro, verificou-se que houve correspondência de escalas no quinto quadrado do retículo e a medida no micrômetro foi 190 μ m. Assim, dez quadrados que compõem o lado do retículo de Whipple equivalem a 380 μ m, um quadrado a 38 μ m e a menor subdivisão do retículo, a 7,6 μ m.

5.3 - Cálculo para contagem de organismos e células

5.3.1 - Contagem de organismos

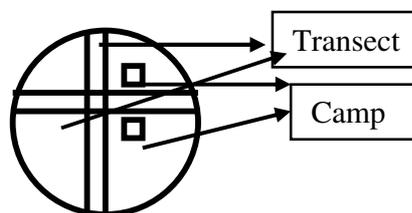
Os organismos fitoplanctônicos podem ser unicelulares, multicelulares, filamentosos ou coloniais. Assim, pela variedade de formas e configurações, a contagem pode ser um problema para o analista. Por exemplo: um indivíduo colonial com 4 células, como *Scenedesmus*, pode ser contado como um organismo. Já para as diatomáceas, em uma cadeia de células ou colônia, conta-se cada célula como um organismo. Por exemplo: uma colônia de *Asterionella* conta-se cada célula como um organismo pois os indivíduos estão unidos apenas por espinhos ou por mucilagem.

No uso do retículo para a contagem de organismos, é necessário estabelecer critérios: por exemplo, quando os indivíduos não estão totalmente dentro da grade, como mostrado na figura abaixo, pode-se estabelecer que se o organismo estiver com mais de 50% da sua área fora do retículo, este não deverá ser contado e se estiver com mais de 50% da sua área dentro, deverá ser contado.



Observação 4: *O aumento ideal para a contagem em microscópio invertido é de 400X.*

Dependendo da concentração de organismos, a subamostra será analisada integralmente ou parcialmente por meio da contagem de transectos ou campos aleatórios, com o auxílio do retículo de Whipple calibrado.



5.3.2 - Contagem de células de cianofíceas (cianobactérias)

Para atender à Portaria nº 518 (BRASIL, 2004) e à Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), as estações de tratamento de água terão que providenciar a contagem de células de cianofíceas para o manancial de abastecimento. Esta metodologia foi desenvolvida com base nas orientações descritas em Lawton. (1999).

O grupo das cianofíceas possui formas filamentosas, coloniais e solitárias. Para a contagem de células das colônias e filamentos, podem ser utilizados os seguintes métodos:

- a) Formas coloniais - As células de cianofíceas coloniais são agregadas por bainhas ou mucilagens. Para facilitar a contagem de células, quando estes organismos são dominantes, por exemplo, em florações, é recomendável dissolver estas mucilagens e desmembrar as colônias em células soltas.

Uma das metodologias de dissolução da mucilagem é a digestão a quente com hidróxido de potássio (KOH) a uma molaridade de 0,03M: coloca-se o hidróxido de potássio na amostra na proporção 1:1. Mantêm-se as amostras em estufa a 80°C-90°C por 15 minutos.

Após a digestão, a amostra pode ser preparada em câmaras de Sedgwick-Rafter ou em câmaras de Utermöhl, para quantificação. Com este método não é possível identificar os organismos.

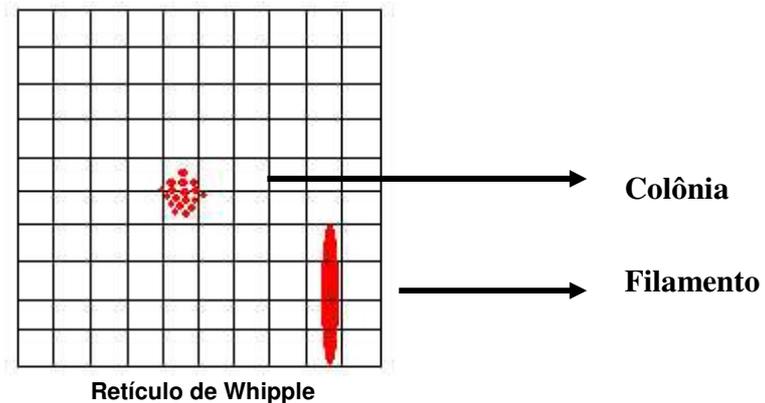
Outra metodologia consiste em utilizar o retículo de Whipple como auxiliar na contagem de células de formas coloniais. Pode-se contar quantas células ocupam cada quadrado do retículo, calcular a média de 10-30 quadrados e multiplicar esse número pelo número de quadrados ocupados pela colônia (vide esquema a seguir).

- b) Formas filamentosas - As cianofíceas filamentosas são organizadas por células e conectadas por parede celular, formando os filamentos que, envoltos pela bainha, são denominados tricomas. As células podem ser cilíndricas, quadráticas, mais longas que largas, mais largas que longas ou esféricas, dependendo da ordem, família ou gênero a que pertençam.

A contagem de células de cianofíceas filamentosas pode ser feita de duas maneiras. Em caso de amostras com filamentos de comprimento uniforme, contam-se as células dos primeiros trinta filamentos e calcula-se a média de células por filamento para cada espécie, valor que posteriormente será multiplicado pelo número de filamentos contados. No caso de amostras com filamentos de comprimento muito variável, pode-se contar o número de células por quadrado do retículo e multiplicar pelo número de retículos que compõem os filamentos.

- c) Amostras mistas com formas coloniais e filamentosas - Em amostras com colônias e filamentos nas quais não seja possível a dissolução da mucilagem, pode-se utilizar o retículo de Whipple. Caso as colônias sejam muito densas, e levando-se em conta que estas podem possuir várias camadas de células, pode-se multiplicar o número de células contado em cada quadrado do retículo por 2, ou pelo número de camadas existentes, para obter uma estimativa mais precisa.

Quanto às filamentosas, caso não seja possível a visualização das células em aumento de 40X, pode ser medido o comprimento do tricoma e, com auxílio de bibliografia especializada, verificar o comprimento celular e assim estimar o número de células por tricoma.



5.3.3 - Cálculo para contagem de organismos em câmara de Sedgwick-Rafter

A contagem de organismos de uma faixa horizontal corresponderá à contagem dos organismos contidos no retângulo cuja largura será delimitada pelo reticulo de Whipple (que é igual a 380µm, ou 0,038cm, no exemplo citado no item 5.2.6) e o comprimento será o da própria câmara (5cm). A área desse retângulo será igual a 0,19cm². Como a área da câmara de Sedgwick-Rafter é de 10cm² e a área examinada é de 0,19cm², dividindo-se a primeira pela segunda, obter-se-á o fator de contagem para esse microscópio.

$$F = A/a$$

Onde:

F = fator de contagem

A = área da câmara

a = área de faixa horizontal

Exemplo: F = 10/0,19 = 52,63

Para a contagem de organismos numa faixa vertical, utiliza-se o mesmo raciocínio. Neste caso, o fator de contagem é obtido da seguinte forma:

$$F = A/a$$

Onde:

a = área da faixa vertical

Exemplo: F = 10/2 x 0,038 = 131,58

Multiplicando-se o número de células ou organismos de um mesmo gênero ou espécie encontrados em uma faixa da câmara, pelo fator de contagem, obter-se-á o número de células ou organismos deste gênero ou espécie contidas em 1mL da amostra preservada com lugol. Se a amostra foi concentrada 10 vezes, o fator de contagem será dividido por 10 antes de se calcular o número de organismos por mL. O fator de contagem de organismos em 1 ou mais campos é obtido dividindo-se a área da câmara pela área total dos campos delimitados pelo reticulo de Whipple. Assim, por exemplo, para 10 campos, o fator será:

$$F = A/10a$$

$$F = A/10a$$

a = área do reticulo de Whipple

Exemplo: F = 10/10 x (0,038)² = 692,52

Quando se tem uma densidade muito elevada de organismos por campo (10 ou mais), a contagem por campos aleatórios, utilizando-se uma área menor, é mais indicada do que por transectos, que

demanda maior tempo e esforço. O número de campos irá depender da densidade da amostra e da acuracidade desejada.

O número de organismos/mL ou células/mL é calculado multiplicando-se o número de unidades contadas pelo fator. Quando a amostra é fixada com formol 2%, este representa 5% do volume total da amostra, e nesse caso, o fator deve ser dividido por 0,95.

5.3.4 - Cálculo dos organismos em câmara de Utermöhl

Em microscópio invertido, pode-se fazer a contagem da câmara por transectos, correspondentes ao diâmetro da câmara e multiplicar pelo fator de concentração, obtendo-se o número de organismos. A determinação do fator de concentração é feita dividindo-se a área da câmara pela área total dos transectos lidos.

Exemplo: Um invertoscópio com objetiva de 40X e ocular de 10X, equipado com retículo de Whipple que mede 192µm de lado. A área interna de uma câmara de invertoscópio corresponde à de um círculo cujo diâmetro interno é igual a 2,6cm.

$$A = \pi R^2$$

Portanto:

Onde

$$A = \pi R^2 \quad \text{área da câmara de Utermöhl}$$

$$\pi = 3,1416$$

Exemplo: $A = 3,1416 \times (1,3)^2 = 5,3093\text{cm}^2$

O transecto terá 0,0192cm de largura (lado do retículo de Whipple) por 2,6cm de comprimento (diâmetro da câmara).

Assim:

$$F = \frac{A/a''}{v}$$

A área do transecto = $0,0192 \times 2,6 = 0,0499\text{cm}^2$
 área dos transectos = $0,0998\text{cm}^2$

com volume de 2mL teremos:

$$F = \frac{A/a''}{v} = \frac{5,3093/0,0998}{2} = 26,5997 = 26,60$$

Multiplicando-se o fator assim obtido pelo número de organismos ou células encontrados em dois transectos, ter-se-á o número de organismos ou células por mL de amostra preservada com lugol. A localização de um transecto na câmara para a contagem de transectos é feita pelo retículo de Whipple, superpondo-o a borda da câmara. A partir deste ponto, inicia-se o exame até que o retículo atinja o outro lado da câmara. Quando a amostra é preservada com formol 2%, este passa a representar 5% do volume total da amostra. Neste caso, para o cálculo do fator, deve-se subtrair 5% do volume da câmara.

5.5 - Estimativas de biomassa

a) Cálculo de UPA

Em exames de água para abastecimento, além da contagem e identificação, pode ser calculada a área de cada organismo, tendo sido adotada para isso uma unidade padrão de área (UPA), cujo valor é $400\mu^2$. Utiliza-se um fator de correção para o retículo de Whipple do microscópio, para a unidade padrão $400\mu^2$. Se o quadrado menor do retículo de Whipple medisse 20μ de lado, sua área seria exatamente a de 1UPA. Como é difícil adaptar o microscópio de tal forma que a área do quadrado menor seja de 1UPA, calcula-se o fator de correção da seguinte maneira: para um retículo que possua 380μ de lado, o quadrado menor terá $7,60\mu$ de lado. A área deste quadrado menor será de $57,76\mu^2$. Dividindo-se $400\mu^2$ por $57,76\mu^2$ verifica-se que a área deste quadrado é 6,93 vezes menor que 1UPA, portanto 6,93 será o fator de correção.

Durante o exame, cada alga é superposta aos quadrados pequenos do retículo de Whipple, anota-se o número de quadrados que ela ocupa, supondo que cada um equivale a 1UPA. Este número suposto de UPA está superestimado pois na realidade, cada quadrado tem uma área 6,93 vezes menor que 1UPA. Dividindo-se o número de quadrados ocupados por uma alga, por 6,93, tem-se o número de UPA que ela realmente ocupa.

b) Cálculo de biovolume

Em estudos ecológicos e também para atendimento à Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004) e Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), a estimativa de biomassa mais aceita é o biovolume.

No cálculo do biovolume celular, contam-se as células e o resultado é multiplicado pelo volume celular médio de cada espécie. O volume médio é determinado com base na figura geométrica mais próxima, por exemplo, esferas para células esféricas e cilindros para filamentos. Dependendo da variabilidade, 10 a 30 células devem ser medidas.

Exemplo: Ao se medirem 20 células de *Microcystis*, foi estimado um diâmetro médio de 5µm. Assumindo que a forma da célula aproxima-se de uma esfera, cujo volume é $4/3\pi r^3 = 65,4\mu\text{m}^3$, ao se quantificar 1 milhão de células por mL, o biovolume será $65,4 \times 10^6 \mu\text{m}^3/\text{mL}$.

5.6 - Estimativa do erro na contagem

O objetivo da contagem dos organismos fitoplanctônicos é assegurar que o número quantificado represente o mais próximo possível, o tamanho da população natural. Em função dos erros inerentes ao método, nunca é alcançado o valor real, mas é avaliada a probabilidade de que o valor medido se encontre, dentro de certos limites, em torno do valor verdadeiro. Ao se iniciar a contagem, é essencial avaliar o nível de precisão requerido. É importante verificar se a distribuição dos organismos no fundo da câmara é aleatória, e caso não seja, os dados necessitam ser normalizados antes da estimativa de erro ou limites de confiança.

Para um limite de confiança de 95%, o erro de contagem expresso em porcentagem pode ser estimado pela fórmula:

$$\text{erro de contagem (\%)} = \frac{2}{\sqrt{N}} \times 100\%$$

Onde: N é o número de unidades contadas.

5.7 - Identificação dos organismos fitoplanctônicos:

O nível de identificação depende dos objetivos e do treinamento dos analistas. O treinamento de técnicos para a contagem de fitoplâncton, mesmo com experiência anterior em microscopia e conhecimento prévio de morfologia celular, é muito demorado, mesmo para identificação apenas em nível de gênero.

As espécies dominantes ou problemáticas devem ser avaliadas em nível específico.

Para estudos mais gerais e monitoramento de estações de tratamento pode-se utilizar identificação em nível de gênero, porém estudos ecológicos requerem identificação em nível específico.

Para identificação de espécies de cianofíceas filamentosas e flagelados, é importante a observação prévia da amostra não preservada, pois o movimento pode ser caráter taxonômico e a forma e coloração podem ser alteradas na preservação.

Após reconhecimento da amostra viva, procede-se à preservação, identificação e contagem dos organismos.

Para a identificação dos organismos deve ser utilizada bibliografia especializada. (item 11.1).

Expressão dos Resultados

6.1 - Exame qualitativo e semi-quantitativo

O resultado do exame da comunidade fitoplanctônica de um manancial pode ser expresso qualitativamente, por meio da listagem dos táxons observados na amostra analisada, ou semi quantitativamente, pela frequência ou abundância relativa dos organismos presentes na amostra, quando não se têm condições de avaliar o volume da amostra. A quantidade de organismos presentes na alíquota contada é convertida para frequência de ocorrência, segundo a expressão:

$$\% Sp_i = \frac{N_i \times 100}{N}$$

Onde:

Sp_i = espécie i

N_i = número de organismos da espécie i

N = número total de organismos na alíquota.

6.2 - Exame quantitativo

O resultado do exame de fitoplâncton em mananciais é expresso geralmente em número de organismos/mL. O resultado do exame de fitoplâncton em águas para abastecimento é expresso, além do número de organismos/mL, em número de UPA/mL ou céls./mL.

Observação 5: Certos tipos de organismos, quando excedem determinado número de UPA/mL ou número de células, podem causar problemas de sabor e/ou odor, obstrução de filtros e toxicidade na água.

Controle Laboratorial e Estocagem

Após a análise, uma subamostra é mantida em um frasco devidamente etiquetado. A etiqueta deve conter todas as informações necessárias para a pronta identificação da amostra. É recomendado manter um registro de todas as amostras analisadas e estocadas. A estocagem, especialmente de amostras preservadas com lugol, deve ser no escuro, com reposição periódica do conservante com duração de até 3 meses. O prazo de estocagem é de 6 meses a vários anos para amostras preservadas com formol.

Equipamentos de Coleta e Análise do Fitoplâncton de Água Doce

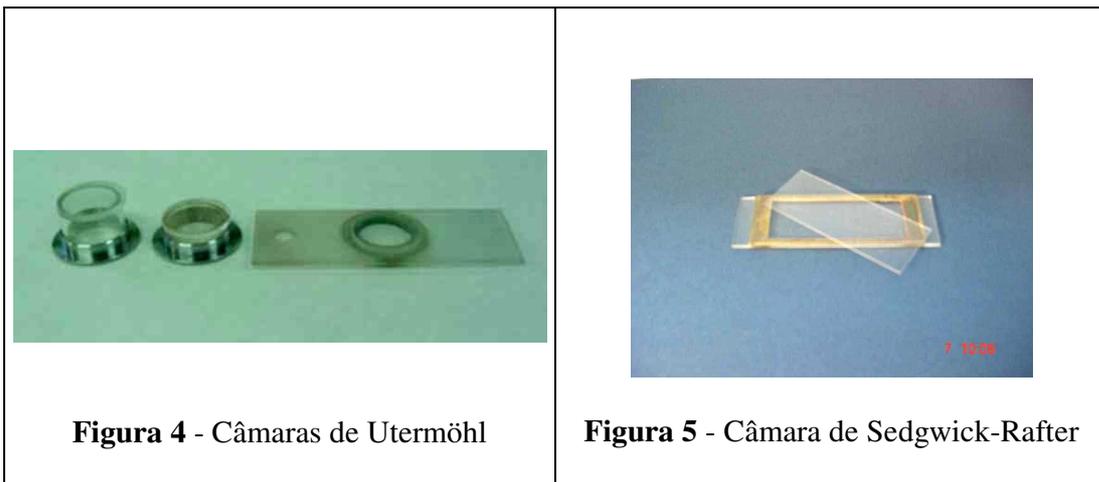
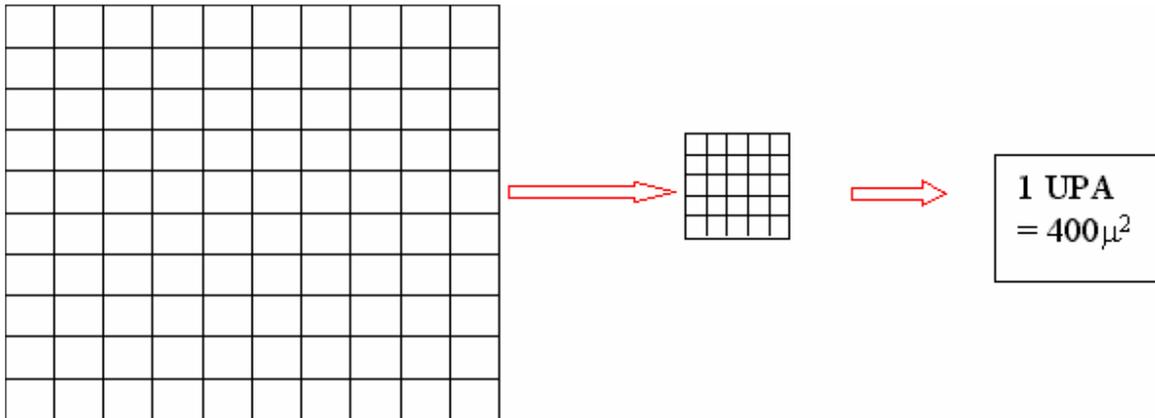
Figura 1 - Garrafa de van Dorn



Figura 2 - Rede de Plâncton



Figura 3 - Retículo de Whipple



Modelo de Ficha de Análise do Fitoplâncton de Água Doce

FICHA DE LEITURA - FITOPLÂNCTON

LOCAL DE COLETA _____ DATA DA COLETA _____

PONTO/RÉPLICA _____ DATA DA ANÁLISE ____ / ____ / ____

Nº DA AMOSTRA _____ NOME DO CLIENTE _____

FATOR DE CONCENTRAÇÃO _____ FATOR DE CORREÇÃO _____

CIANOFÍCEAS	Nº ORGANISMOS	Nº UPA
CLOROFÍCEAS	Nº ORGANISMOS	Nº UPA

DIATOMÁCEAS	Nº ORGANISMOS	Nº UPA
EUGLENOFÍCEAS	Nº ORGANISMOS	Nº UPA
FITOFLAGELADOS	Nº ORGANISMOS	Nº UPA
XANTOFÍCEAS	Nº ORGANISMOS	Nº UPA
OBSERVAÇÕES: células de cianobactérias (céls./mL)=		

Exemplo de Boletim Técnico

BOLETIM DE ANÁLISE FITOPLÂNCTON DE ÁGUA DOCE

Nº Amostra:

Data Coleta:

Data Entrada:

Data Emissão:

Dados do Cliente:

Nome:

Município:

U.F:

Dados de Campo:

Manancial:

Local:

Coletor:

Fator de Concentração: 2,12

Fator de Correção: 27,04

RESULTADOS

GRUPO	Nº ORG/mL	Nº UPA/mL
CIANOFÍCEAS		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	20	15,0
<i>Pseudanabaena mucicola</i>	15	7,5
CLOROFÍCEAS		
<i>Scenedesmus bicaudatus</i>	5	2,5
<i>Chlorella</i> sp.	12	4,0
DIATOMÁCEAS		
<i>Nitzschia palea</i>	30	12,0
<i>Cyclotella</i> sp.	25	6,0
FITOFLAGELADOS		
<i>Strombomonas</i> sp.	5	2,5
<i>Cryptomonas</i> sp.	10	8,0
	Total:122	35,0

Observação:

Metodologia:

Nota:

Biólogo Responsável
CRBio nº.

11. Referências Bibliográficas

- AGUDO, E. G. (Coord.). Guia de coleta e preservação de amostras de água. São Paulo: CETESB, 1988.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. New York: APHA:AWWA:WEF, 1998.
- BOX, J. D. Enumeration of cell concentration in suspension of colonial freshwater microalgae, with particular reference to *Microcystis aeruginosa*. Br. Phycol. J., v. 16, p. 153-164, 1981.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 03/2004. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA n° 357 de 03/2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.
- CETESB (São Paulo). L5.303: determinação de fitoplâncton de água doce métodos qualitativo e quantitativo: método de ensaio. São Paulo, 1991.
- HOPKINS, G. J.; STANDLKE, S. J. Phytoplankton methods manual with special emphasis on waterworks operation internal. Ontario: Ministry of the Environment, 1992.
- HÖTZEL, G. J.; CROOME, R. A phytoplankton methods manual for australian freshwaters. Canberra, Australia: Land and Water Resources Research and Development, 1999.
- JARDIM, F. A. et al. Metodologia para a contagem de cianobactérias em células/mL: um novo desafio para o analista de laboratório. Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro, v. 7, n° 3/4, p. 109-111, 2002.
- LAWTON, L. et al. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: CHORUS I.; BARTRAM, J. Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon, 1999. 416 p.
- REYNOLDS, C. S.; JAWORSKI, G. H. M. Enumeration of natural *microcystis* populacions. Br. Phycol. J., v. 13, p. 269-277, 1978.
- ### 11.1 - Referências Bibliográficas para Identificação do Fitoplâncton de Água Doce
- ANAGNOSTIDIS, K.; KOMÁREK, J. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 1 introduction. Arch. Hydrobiol.: algological studies, v. 38/39, p. 291-302, 1985. Suppl. 71.
- _____. Modern approach to the classification system of cyanophytes: 3 oscillatoriales. Arch. Hydrobiol.: algological studies, v. 50-53; p. 327-472, 1988. Suppl. 80.
- BOURRELLY, P. Les algues d'eau douce: initiation à la systematique. Paris: N. Boubée, 1968. Tome 2: Les algues jaunes et brunes. 438 p.
- _____. Les algues d'eau douce: initiation à la systematique. Paris: N. Boubée, 1970. Tome 3: Les algues bleues et rouges. 512 p.
- _____. Les algues d'eau douce: initiation à la systematique. Paris: N. Boubée, 1972. Tome 1: Les algues vertes. 569p.
- DILLARD, G. E. Common freshwater algae of the United States: an illustrated key to the genera (excluding the diatoms). Berlin; Stuttgart: J. Cramer, 1999. 173 p.
- ETTL, H. Xantophyceae. Stuttgart: Gustav Fischer, 1978. 530 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa Band 3, Teil 1)
- GEITLER, L. Cyanophyceae. In: Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz 14. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1932. v. 1, p. 1356.
- HUBBER-PESTALOZZI, G. Das phytoplankton des süßwassers: systematik und biologie. Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von Dr. August Thienemann. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche, 1938. 342 p. (Die Binnengewässer: Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten, Band 16, Teil 1).
- _____. Das phytoplankton des süßwassers: cryptophyceae, chloromonadophyceae, dinophyceae. Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von Dr. August Thienemann. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche, 1968. 322 p. (Die Binnengewässer: Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten, Band 16, Teil 3. Auflage 2).

_____. Das phytoplankton des süßwassers: euglenophyceen. Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von Dr. August Thienemann. Stuttgart: Schweizerbart'sche, 1955. 606 p. (Die Binnengewässer: Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten, Band 16, Teil 4.).

_____. Das phytoplankton des süßwassers: chlorophyceae (Grünalgen) ordnung: volvocales. Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von Dr. August Thienemann. Stuttgart: Schweizerbart'sche, 1961. 744 p. (Die Binnengewässer: Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten, Band 16, Teil 5.).

_____. Das phytoplankton des süßwassers: chrysophyceen. Unter Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben von Dr. August Thienemann. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche, 1976. 365 p. (Die Binnengewässer: Einzeldarstellungen aus der Limnologie und ihren Nachbargebieten, Band 16, Teil 2, Hälfte 1).

JOHN, D. M.; WHITTON, B. A; BROOK, J. A. (Eds.) The freshwater algal flora of the british isles: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. United Kingdon: Cambridge University, 2002. 702 p.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2 Chroococcales. Arch. Hydrobiol.: algological studies, v. 43, p. 157-266, 1996. Suppl. 73.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota: chroococcales. Jena: Gustav Fischer, 1999. 548 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 19, Teil 1.).

KOMÁREK, J.; FOTT, B. Chlorophyceae (Grünalgen) ordnung chlorococcales. das phytoplankton des süßwassers. Stuttgart: E. Schweizerbart'sche, 1983. 1044 p. (Die Binnengewässer, Band 16, Teil 7.Hälfte 1).

KRAMMER, K.; LANGE-BERTALOT, H. Bacillariophyceae: naviculaceae. Jena; Stuttgart; Lübeck; Ulm: Gustav Fischer, 1997. 876 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa Band 2, Teil 1).

_____. Bacillariophyceae: bacillariaceae, epithemiaceae, surirellaceae. Jena; Stuttgart: Lübeck; Ulm: Gustav Fischer, 1997. 610 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa Band 2, Teil 2).

_____. Bacillariophyceae: centrales, fragilariaceae, eunotiaceae. Stuttgart; Jena: Gustav Fischer, 1991. 576 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa Band 2, Teil 3).

_____. Bacillariophyceae: achnanthaceae. Stuttgart; Jena: Gustav Fischer, 1991. 437 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa Band 2, Teil 4).

_____. Bacillariophyceae. Heidelberg; Berlim: Spektrum Akademischer Verlag, 2000. 311 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa Band 2, Teil 5).

PASCHER, A. Volvocales -Phytomonadinae. Flagellatae IV -Chlorophyceae. 1 In: HUBER-PESTALOZZI. Süßwasser flora deutschland, osterreichs und der schwweiz. Jena: Gustav Fischer, 1927. 506 p.

SMITH, G.M. The freshwater algae of the United States. New York: McGraw-Hill, 1950. 719 p.

WEST, W.; WEST, G.S. A monograph of the british desmidiaceae. New York; London: Johnson Reprint, 1971. 5 v.

(D.O.E. Executivo, de 31.03.06. Republicada em 20.04.06).