



NORMA TÉCNICA

L5.307

Jan/1978
22 PÁGINAS

Método para medir a produtividade primária em ambientes
aquáticos - método do ^{14}C : método de ensaio

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Avenida Professor Frederico Hermann Jr., 345
Alto de Pinheiros CEP 05459-900 São Paulo SP
Tel.: (11) 3133 3000 Fax.: (11) 3133 3402

<http://www.cetesb.sp.gov.br>

CETESB

L5.307

MÉTODO PARA MEDIR A PRODUTIVIDADE PRIMÁRIA EM AMBIENTES AQUÁTICOS

MÉTODO DO ^{14}C

SUMÁRIO

	Páginas
Introdução.....	1/2
1 Objetivo.....	3
2 Referências.....	3
3 Definições.....	3/4
4 Aparelhagem.....	5/6
5 Execução do ensaio.....	6/9
6 Resultados.....	9/11
Anexo A.....	a/1 a a/3
Anexo B.....	b/1
Anexo C.....	c/1
Anexo D.....	d/1
Anexo E.....	e/1
Anexo F.....	f/1
Anexo G.....	g/1
Anexo H.....	h/1 a h/2
Anexo I.....	i/1

INTRODUÇÃO

A vida na biosfera depende da elaboração de matéria orgânica a partir de substâncias inorgânicas encontradas na natureza e de energia luminosa ou química.

Os organismos responsáveis por tal elaboração são denominados produtores primários, sendo, no meio aquático, representados pelo fitoplâncton, perifiton, macrofitas submersas e algumas bactérias que, juntos, constituem a base das cadeias alimentares desses ambientes.

Graças à sua capacidade de sintetizar material orgânico a partir das substâncias inorgânicas, são conhecidos como organismos autotróficos. Estes organismos englobam aqueles que utilizam como energia de síntese a energia luminosa e os que utilizam a energia química, sendo os primeiros denominados de organismos fotoautotróficos ou fotossintetizantes, e os segundos quimioautotróficos ou quimiosintetizantes.

Apenas algumas bactérias têm a capacidade de quimiosíntese, predominando portanto como produtores os vegetais fotoautotróficos; os primeiros ainda que secundariamente sejam também organismos produtores, são dependentes dos segundos (Stemann Nielsen, 1975).

Durante a fotossíntese, a energia radiante é convertida em energia química. Com postos contendo energia química potencial são acumulados nas células e podem ser utilizados mais tarde para organização de novas estruturas vegetais, na respiração e numa série de outros processos bioquímicos.

O mecanismo da fotossíntese envolve processos fotoquímicos e enzimáticos. O processo fotoquímico é proporcional à radiação ou intensidade luminosa, até certo limite, a partir do qual atua o processo enzimático.

Moléculas de clorofilas e de outros pigmentos fotossintetizantes são capazes de absorver "quanta" de energia, convertendo-os em energia química, mediante a redução de compostos de carbono. Parte da matéria orgânica assim produzida é transferida aos níveis tróficos seguintes, e parte é perdida sob a forma de calor.

Nos ecossistemas aquáticos, a maior parte da produção deve-se às algas que integram as populações do fitoplâncton, podendo atingir até 95% dessa produção.

A reprodução rápida de que é capaz a população de algas, quando em condições adequadas de luminosidade e sais nutrientes, numa determinada área, aumenta o "standing-stock" da comunidade, levando a um conseqüente aumento da taxa de produção primária em um dado período de tempo.

Qualquer alteração na produção acarretará, conseqüentemente, modificações nos níveis tróficos e energéticos seguintes.

São de importância fundamental na produção líquida total de um ecossistema os fatores climatológicos que envolvem energia radiante, pluviosidade, e fatores hidrológicos, como por exemplo penetração de luz, estrutura térmica da água, suprimento e dinâmica de nutrientes. Fatores biológicos podem também influenciar a produção, principalmente o aumento do número de organismos do fitoplâncton, embora esse atue mais como um fator regulador do que como um fator limitante.

Como se pode constatar, a fotossíntese é o processo fundamental da produção primária, permitindo assim avaliar a capacidade de um ecossistema de construir, às expensas de energia externa, compostos orgânicos primários de alto potencial químico, para posteriores transformações e fluxo a níveis tróficos superiores.

A produção orgânica de um ecossistema refere-se à quantidade de matéria orgânica acumulada nos diversos níveis tróficos, e sua eficiência depende da complexidade da cadeia alimentar.

Assim, em regiões eutróficas, a produção é maior que em regiões oligotróficas; mas a eutroficação depende de vários fatores globais de um ecossistema e não somente do aumento de nutrientes, e acarreta uma série de modificações no primeiro e segundo níveis tróficos, tais como:

- a) um aumento da produção primária por unidade de volume;
- b) variação sazonal da produção primária;
- c) um provável aumento em valores múltiplos da produção primária anual;
- d) ocorrência de mudanças quantitativas na composição do fitoplâncton;
- e) ocorrência de mudanças qualitativas e quantitativas no zooplâncton herbívoro.

Existem vários métodos para avaliar a produção primária de matéria orgânica pelos organismos fotoautotróficos: os métodos que consideramos como métodos indiretos, e os métodos diretos.

Entre os métodos indiretos, podemos ter, entre outros, a determinação de fosfatos, nitratos e silicatos do meio líquido, a determinação da concentração de pigmentos, etc.. Entre os métodos diretos encontramos, principalmente, o método do oxigênio de Gaarder e Gran (1927) e o método do carbono-14 (^{14}C), introduzido por Steemann Nielsen (1952). No método de Steemann Nielsen (op. cit.), a incorporação do traçador (^{14}C) na matéria orgânica das algas planctônicas é usada como medida de produção.

Nesta Norma são apresentadas as etapas para a aplicação do método do ^{14}C . Nos anexos encontramos principalmente certos aspectos inerentes à técnica.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve o método do carbono radioativo (^{14}C), para a determinação da produtividade primária em ecossistemas aquáticos.

1.2 Os estudos de produtividade primária, têm por finalidades:

1.2.1 Avaliar a capacidade construtiva de um ecossistema, que graças à energia externa (radiante e química) possa sintetizar compostos orgânicos primários de alto potencial químico, os quais são transformados e fluem para os níveis tróficos mais elevados.

1.2.2 O monitoramento ecológico em estados de poluição orgânica e/ou industrial, indicando a extensão e os efeitos dessa poluição.

1.2.3 Fornecer dados sobre o estado trófico de um ambiente aquático.

1.2.4 Subsidiar a interpretação de dados físico-químicos e vice-versa.

1.2.5 Indicar o estado fisiológico da população do fitoplâncton.

1.2.6 Documentar a variabilidade na qualidade da água, como consequência de mudanças naturais e/ou provocadas pelo homem.

1.2.7 Subsidiar estudos de estratificações do fitoplâncton.

2 REFERÊNCIAS

2.1 Norma CETESB - L5.302 - Fitoplâncton Marinho.

2.2 Norma CETESB - L5.306 - Determinação de Pigmentos Fotossintetizantes.

3 DEFINIÇÕES

3.1 Ecossistema

Entende-se por ecossistema ou sistema ecológico, qualquer unidade que inclua todos os organismos em uma determinada área, interagindo com o meio físico, de tal forma que um fluxo de energia leva a uma estrutura trófica definida, diversidade biótica e reciclagem de material (troca de material entre componentes vivos e não vivos).

3.2 Fotossíntese

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

3.3 Eutrofização ou eutroficação

Refere-se à adição natural ou artificial de elementos nutritivos a um corpo d'água, que pode promover o crescimento algal.

3.4 Eutrófico

Ambiente de alta produtividade primária devido ao elevado teor de nutrientes, possuindo elevadas densidades de fitoplâncton.

3.5 Oligotrófico

Ambiente de baixa produtividade primária, devido à pequena quantidade de nutrientes, que são insuficientes para produzir altas densidades de fitoplâncton.

3.6 Fitoplâncton

É o termo utilizado para se referir à comunidade vegetal microscópica que flutua livremente nas diversas camadas de água, estando sua distribuição vertical restrita ao interior da zona eufótica, onde graças à presença de energia luminosa, promove o processo fotossintético, responsável pela base da cadeia alimentar do meio aquático.

3.7 Habitat

O "habitat" de um organismo é o lugar onde ele vive, ou onde se iria encontrá-lo.

3.8 Biomassa

É a quantidade de material vivo, que pode ser expressa em peso, volume, área ou número.

3.9 Produção e produtividade

O termo produção pode ser usado para designar os resultados obtidos com populações naturais e o termo, produtividade é definido como a taxa em que carbono inorgânico é convertido para uma forma orgânica (Standard Methods, 1975), e geralmente refere-se à taxa máxima possível em uma massa de água em condições ideais de iluminação.

3.10 Produtividade primária líquida

Corresponde à taxa de síntese líquida dos constituintes orgânicos do fitoplâncton e pode ser determinada com base no carbono orgânico produzido por unidade de volume ou superfície e refere-se geralmente a fontes inorgânicas de carbono.

3.11 Produtividade primária bruta

Refere-se à síntese bruta dos constituintes orgânicos do fitoplâncton quando não se leva em conta perdas por respiração e excreção.

4 APARELHAGEM

4.1 Aparelhos para amostragem

4.1.1 As amostras destinadas às análises de produtividade primária devem ser coletadas em garrafas especiais, de plástico, tipo Van Dorn por exemplo (detalhe sobre o seu funcionamento na Norma CETESB L5.302 - Fitoplâncton Marinho).

Tais garrafas permitem que se determine estratificações ao longo da coluna d'água, pois podem ser lançadas a quaisquer profundidades, presas a um cabo, e fecham automaticamente através de um dispositivo (mensageiro) enviado através do cabo, coletando assim água da profundidade desejada.

4.1.2 Hidrofotômetro.

4.1.3 Disco de Secchi.

4.1.4 Bomba de vácuo.

4.1.5 Frasco Kitasato de 500 ml.

4.1.6 Tubo de latex de 1 cm de diâmetro, 2 metros de comprimento (para filtração, ligando a bomba de vácuo ao frasco Kitasato).

4.1.7 Gerador portátil (para trabalho em local onde não haja rede elétrica).

4.1.8 Porta filtros para filtração sob pressão, de pyrex ou similar, para membranas de celulose de 25 mm de diâmetro.

4.1.9 Filtros de membrana de celulose de 25 mm de diâmetro com 0,45 μ de poro, enumerados.

4.1.10 Pinças de ponta reta, de aço inoxidável, bordos planos.

4.1.11 Pissetes de 500 ml com água destilada.

4.1.12 Erlenmeyer de 500 ml.

4.1.13 Frascos de pyrex ou similar com volume conhecido (125 ml de capacidade, por exemplo), transparentes, boca estreita, com tampa esmerilhada.

4.1.14 Corda fina, 10 a 20 metros (tamanho variável de acordo com as condições físicas do local de trabalho).

4.1.15 1 rolo de barbante.

4.1.16 Folha de alumínio.

4.1.17 Seringa hipodérmica de 2 ou 5 cc.

4.1.18 Agulhas para seringa.

4.1.19 Serrinhas para ampolas.

4.1.20 Câmara incubadora, com circulação de água do próprio local (conforme esquema no Anexo F).

4.1.21 Frasco de boca larga (para guardar os envelopes com as amostras).

4.1.22 Envelopes (conforme modelo no Anexo D).

4.1.23 Fichas de coleta (Anexo A).

4.2 Aparelhos para a execução da análise

4.2.1 Detector de radiação, para medir a radioatividade das amostras (equipamento tipo "Geiger-Muller" de janela de mica, ou sem janela ("gas-flow") ou espectrômetro de cintilação líquida, por exemplo).

4.2.2 Pinça de aço inoxidável, ponta reta, bordos planos.

4.3 Reagentes

4.3.1 Solução de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ ou $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, contida em ampolas.

4.3.2 Reagentes para a determinação da atividade específica das ampolas de ^{14}C (conforme Anexo A).

5 EXECUÇÃO DO ENSAIO

5.1 Princípio do método

5.1.1 Este método descreve a determinação da produtividade primária de ambientes aquáticos pelo uso de detectores de radiação (tipo Geiger-Muller ou cintilador líquido, por exemplo).

5.1.2 A determinação da produtividade primária é realizada através do método direto do carbono radioativo (^{14}C).

5.1.3 O método fornece resultados em termos de $\text{mgC}/\text{m}^2/\text{h}$ ou $\text{mgC}/\text{m}^3/\text{h}$.

5.1.4 O método descrito pode ser aplicado para trabalhos do tipo "in-situ" ou do tipo "simulado".

5.1.4.1 Na técnica "in-situ" as amostras são colocadas em diferentes profundidades correspondendo geralmente a 100%, 50%, 25%, 10% e 1% da intensidade luminosa na superfície.

5.1.4.2 Na técnica "simulado" as amostras são colocadas em incubadoras especiais (Anexo F).

5.2 Amostragem

5.2.1 As amostras destinadas às determinações da produtividade primária são coletadas com garrafas apropriadas (4.1.1).

5.2.2 As profundidades de coleta são selecionadas em função das medidas do disco de Secchi.

5.2.2.1 Normalmente, coleta-se água da superfície (100% de penetração de luz incidente e à profundidade correspondente a 2,5 vezes a profundidade Secchi - aproximadamente 1% de penetração de luz).

5.2.3 As profundidades de coleta podem também serem selecionadas em função das intensidades luminosas, medidas com um hidrofotômetro.

5.2.3.1 Normalmente as amostras são colocadas em diferentes profundidades, correspondendo geralmente a 100%, 50%, 25%, 10%, 1% da intensidade luminosa na superfície.

5.2.4 O método consiste em se descer a garrafa à profundidade desejada, após o que, um mensageiro é enviado pelo cabo, promovendo o fechamento da garrafa, que é trazida então à superfície contendo no seu interior água da profundidade de coleta.

5.2.5 Retirar alíquotas da amostra trazida à superfície, para a determinação da alcalinidade total e pH.

5.2.6 Retirar ainda uma alíquota de aproximadamente 300 ml, colocando-a num erlenmeyer.

5.2.7 Inocular à água a ser testada, por meio de uma seringa hipodérmica com agulha, a solução de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$, ou $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, contida nas ampolas.

5.2.7.1 A concentração de ^{14}C na amostra poderá ser de aproximadamente $10 \mu\text{Ci/litro}$ (para significância estatística, deverá fornecer pelo menos 1000 ipm (impulsos por minuto) na amostra filtrada).

5.2.8 Homogeneizar bem a amostra, e fracioná-la imediatamente em dois frascos devidamente limpos e enumerados (4.1.13), completamente cheios e bem fechados.

5.2.9 Embrulhar um dos frascos com folha de alumínio, para garantir que nenhuma luz penetre na amostra (frasco escuro) e colocá-lo, juntamente com sua réplica (frasco claro), numa câmara incubadora (4.1.20) ou prendê-las a uma corda nas profundidades referidas no item 5.1.4.

5.2.9.1 Pelo menos um frasco claro e outro escuro devem ser preparados para cada nível de coleta.

5.2.10 Incubar as amostras assim processadas, na câmara incubadora ou na coluna d'água (5.1.4.1), durante um período de 4 horas.

5.2.10.1 Esse período pode ser suficiente para promover um "input" de energia suficiente, usado como base para integração do período de incubação, para o foto período todo.

5.2.11 Ao final do tempo de incubação, remover as amostras, colocando-as no es curo, e filtrá-las em filtros de membrana de celulose imediatamente.

5.2.11.1 A quantidade de água a ser filtrada, depende muito da densidade fito planctônica; por exemplo, em águas oligotróficas, todo o volume da garrafa deve ser filtrado, entretanto, em situações eutróficas, basta uma alíquota de 10 ml e em regiões mesotróficas, 50 ml é o suficiente.

5.2.12 Filtrar preferencialmente 2 porções de cada amostra, aplicando um vácuo de 0,3 atm. durante a filtração (nunca excedendo 0,5 atm) a fim de que não haja rompimento das células mais frágeis e conseqüentemente perda de ^{14}C incorporado, através dos poros dos filtros.

5.2.13 Terminada a filtração, retirar a membrana com o auxílio de uma pinça e colocá-la num envelope (4.1.22) contendo todas as anotações necessárias. Guar dâ-lo num frasco de boca larga até o momento da leitura.

5.3 Procedimento

5.3.1 Procedimento do ensaio utilizando-se um detector de radiações do tipo Geiger-Muller de janela de mica ou sem janela.

5.3.1.1 Em laboratório, os filtros são colocados em dessecadores. Se houver precipitado de carbonatos, é aconselhável expor as membranas a vapores de HCl fumegante, por 10 minutos, a fim de se remover o ^{14}C extracelular possivelmente existente no precipitado. (Este procedimento é recomendado para a descontaminação da amostra).

5.3.1.2 Os filtros são levados a um contador "Geiger-Müller", a radioatividade das amostras é determinada, e o número de cpm (contagens por minuto) é anotado numa ficha de leitura (Anexo E).

5.3.1.3 Corrigir estas leituras subtraindo-se o BG (Back-Ground) do contador. Recomenda-se medir o BG do contador, a cada 3 ou 4 filtros contados.

5.3.2 Procedimento do ensaio, utilizando-se um espectrômetro de cintilação líquida.

5.3.2.1 Essa técnica oferece várias vantagens em relação às técnicas "Geiger-Muller" usadas:

- a) a eficiência de contagem para cada amostra é determinada num equipamento de alta precisão, sendo tal eficiência normalmente superior às obtidas num contador "Geiger-Müller" normal.
- b) os filtros são colocados diretamente dentro dos frascos de contagem, eliminando-se a necessidade de colocar os filtros em pranchetas, não perdendo tempo, e eliminando a possibilidade de contaminação ou perda de material radioativo.

5.3.2.2 Dissolução dos filtros para contagem:

- a) adicionar cuidadosamente aos frascos de contagem, a solução cintiladora (descrita no Anexo B);
- b) transferir cuidadosamente os filtros para o interior dos frascos de cintilação;
- c) esperar alguns minutos até que se complete a dissolução dos filtros, e determinar a atividade das amostras num espectrômetro de cintilação líquida;
- d) anotar as contagens obtidas numa ficha de leitura (Anexo E) ou pela unidade impressora de dados do equipamento.

NOTA: O procedimento descrito evita problemas envolvendo a geometria de contagem e auto-absorção, que podem resultar nas contagens com filtros secos.

6 RESULTADOS

6.1 Expressão dos resultados

6.1.1 A quantidade de ^{12}C assimilado é determinada por medidas da radiação β do plâncton, através de contadores "Geiger-Müller" ou cintiladores líquidos.

6.1.2 A quantidade de ^{12}C assimilado, pode ser determinada, ou estimada se as seguintes condições forem assumidas:

- a) ^{14}C é assimilado da mesma forma que ^{12}C ; nenhum ^{14}C é incorporado por outros processos a não ser a fotossíntese;
- b) nenhum ^{14}C assimilado é perdido por excreção;
- c) nenhum ^{14}C é perdido por respiração.

6.1.3 Para efeitos de tais correções, subtrai-se a contagem média da amostra do frasco escuro, da contagem média do frasco claro, para cada par.

6.1.4 Dessa forma, a concentração de carbono assimilado, por litro, por hora, pode ser determinado a partir de:

$$^{12}\text{C} \text{ assimilado} = \frac{^{14}\text{C} \text{ assimilado (II)}}{^{14}\text{C} \text{ disponível (III)}} \times ^{12}\text{C} \text{ disponível (I)} \times K_{1,2,3} \text{ (equação I)}$$

onde:

(I) ^{12}C disponível = equivale à concentração total de carbono inorgânico, e pode ser determinado através das medidas de pH, alcalinidade total, salinidade e temperatura da água.

NOTA: Existem vários métodos para se medir a concentração total de carbono inorgânico disponível para a fotossíntese (CO_2 livre, ions carbonatos e bicarbonatos).

Em ambientes marinhos a quantidade de CO_2 total não varia muito devido ao fato de a água do mar funcionar como uma solução tampão cujo pH está sempre entre limites definidos (normalmente 8,16 a 8,3). Para esses ambientes, é assumido um valor constante de 90 mg/l de CO_2 total (Steemann Nielsen, 1952). Em ambientes

lacustres, ou de baixa salinidade, a quantidade de carbono inorgânico total pode ser determinada gasometricamente, através de cromatógrafo a gás, ou potenciometricamente, por titulação (Standard Methods, 1975 - Seção 407).

Potenciometricamente, determina-se a concentração total de CO₂ livre, a alcalinidade devida aos ions carbonatos e alcalinidade devida aos ions bicarbonatos. Desta forma, a concentração de carbono inorgânico total, pode ser estimada a partir de:

$$\text{CO}_2 \text{ total} = \text{CO}_2 \text{ livre} + 0,88 (A + B)$$

onde: A = Alcalinidade devido aos ions carbonatos
B = 1/2 alcalinidade devido aos ions bicarbonatos

Em ambientes lacustres ou de baixa salinidade, com pH variando entre 7 e 10 a quantidade de carbono inorgânico total pode ser determinada a partir das medidas de alcalinidade total em Mequ, pH e temperatura, desta maneira:

$$^{14}\text{C} \text{ disponível} = \text{alcalinidade em Mequ} \times \text{fpH}_T \times 12$$

onde: fpH_T (fator pH - temperatura) pode ser obtido através do gráfico 1 (Anexo 5) (de Buch, 1945 in Vollenweider, 1969).

(II) - ¹⁴C assimilado = (contagem dos filtros - BG) x 1,06.

onde: 1,06 = correção para efeito isotópico

(III) - ¹⁴C disponível = atividade total do ¹⁴C adicionado à amostra.

K1 - período de incubação 1/T. Por exemplo, se a exposição efetiva foi de 4h esse fator será 1/4 = 0,25.

K2 - correção para o fator alíquota. Se por exemplo, 50 ml do frasco contendo 125 ml são filtrados e 1 ml da solução de trabalho foi adicionada, então o fator alíquota será 125/50 = 2,5.

K3 - fator dimensional, para converter mg/l a mg/m³, etc.

NOTA: Com a prática a pessoa torna-se familiar com a quantidade de ¹⁴C a ser adicionada aos frascos de maneira a produzir uma moderada radioatividade no plâncton para ensaio, tempo de incubação, quantidade filtrada. Para muitos lagos de moderada produtividade uma adição de 1 a 3 μ Ci por 125 ml de amostra, com 4 horas de incubação e 50 ml de volume filtrado é o suficiente, e em regiões bem eutrofizadas, recomenda-se até 10 μ Ci por 125 ml.

Exemplo: Suponhamos os seguintes dados obtidos experimentalmente (Vollenweider, 1969):

- a) Alcalinidade = 0,67 Mequ
- b) pH = 7,8
- c) Temperatura = 15°C
- d) fpH_T (obtido pelo gráfico 1) = 1,04
- e) Atividade total adicionada em porções de 1 ml/127 ml = 100.000 cpm
- f) Atividade contada nos filtros - BG = 500 cpm
- g) Volume filtrado = 50 ml
- h) Volume do frasco = 127 ml
- i) Tempo de exposição = 5 h
- j) Correção devido ao efeito isotópico = 1,06.

Sabe-se que:

$$^{12}\text{C disponível} = \text{alcalinidade} \times \text{fpH}_T \times 12 \quad (= \text{mg } ^{12}\text{C/l disponível}).$$

$$^{14}\text{C assimilado} = \text{atividade contada nos filtros} \times 1,06.$$

$$^{14}\text{C disponível} = \text{atividade total adicionada ao frasco}.$$

portanto:

$$^{12}\text{C disponível} = 0,67 \times 1,04 \times 12 = 8,36 \text{ mg/l}$$

$$^{14}\text{C assimilado} = 500 \times 1,06 \text{ cpm}$$

$$^{14}\text{C disponível} = 100,000 \text{ cpm (6.1.4(e))}$$

Pela equação (1)

$$^{12}\text{C assimilado} = \frac{^{14}\text{C assimilado}}{^{14}\text{C disponível}} \times ^{12}\text{C disponível} \times K_{1,2,3}$$

$$\text{onde: } K_1 = \frac{1}{T} = \frac{1}{5} = 0,2$$

$$K_2 = \frac{\text{volume frasco} - \text{volume de solução de } ^{14}\text{C adicionado}}{\text{volume filtrado}} = \frac{127 - 1}{50} = 2,52$$

$$K_3 = \text{fator dimensional para converter mg/l a mg/m}^3 = 1000$$

portanto; substituindo-se na equação (1)

$$^{12}\text{C assimilado} = \frac{500 \times 1,06}{100.000} \times 8,36 \times 0,2 \times 2,52 \times 1000 = 22,3 \text{ mg/m}^3/\text{h. ou}$$

$$\underline{22,3 \text{ } \mu\text{g/l/h}}$$

ANEXO ADETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DAS AMPOLAS DE ^{14}C UTILIZADASEM ESTUDOS DE PRODUTIVIDADE PRIMÁRIA

A atividade específica das ampolas de ^{14}C utilizadas em análises de produtividade de primária é conhecida somente aproximadamente, embora a atividade original do composto marcado seja determinada pelo fabricante, e apesar da atividade final da solução de trabalho poder ser encontrada por cálculos, uma certa quantidade de atividade pode ser perdida durante manipulações subsequentes. É portanto necessário determinar a atividade final da solução (Vollenweider, 1969).

As determinações através de detectores "Geiger-Müller" são essencialmente diferentes daquelas efetuadas com um cintilador líquido.

Basicamente as duas técnicas são abordadas da seguinte maneira:

- a) Num contador "Geiger-Müller" os filtros previamente preparados são normalmente colocados em pranchetas, secados num dessecador antes da contagem;
- b) Num cintilador, a atividade das ampolas é determinada diretamente.

A-1 Técnica "Geiger-Müller" para a determinação da atividade específica das ampolas de ^{14}C (Standard Methods, 1975)A-1.1 Reagentes

A-1.1.1 3 ampolas de ^{14}C .

A-1.1.2 Na_2CO_3 - dissolver 1,36 g de Na_2CO_3 para cada litro de água destilada.

A-1.1.3 BaCl_2 a 1,04% - solução de BaCl_2 a 1,04%: dissolver 1,04 g de BaCl_2 em 100 ml de H_2O destilada.

A-1.2 Equipamentos

A-1.2.1 Pinças ponta reta, bordos planos.

A-1.2.2 Filtros de membrana de celulose de $0,45\ \mu$ de poro, e 25 mm de diâmetro.

A-1.2.3 Dessecadores.

A-1.2.4 Balança analítica.

A-1.2.5 Detector de radiação tipo "Geiger-Müller" de janela de mica, ou sem janela.

A-1.3 Procedimento

A-1.3.1 Diluir cada ampola em 500 ml da solução de Na_2CO_3 (A-1.1.2).

A-1.3.2 Pipetar porções de 0; 0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5 e 5,5 ml da solução de Na_2CO_3 (A-1.1.2) em 7 tubos de ensaio devidamente limpos e enumerados.

A-1.3.3 Pipetar porções de 0,5 ml da solução do item A-1.3.1 e adicionar nos tubos de ensaio (A-1.3.2).

A-1.3.4 Adicionar respectivamente porções de 0,5; 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0 e 3,6 ml da solução de cloreto de bário ($BaCl_2$) (A-1.1.3) nos tubos de ensaio 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (A-1.3.3).

A-1.3.5 Após este procedimento haverá a formação de um precipitado de $BaCO_3$ nos tubos de ensaio.

A-1.3.6 Homogeneizar muito bem, e filtrar cada precipitado em filtros de membrana de celulose (A-1.2.2) secos e pesados, secando os filtros sob pressão, sem lavá-los com jatos de água destilada, pois a deposição do precipitado sobre os filtros deve ocorrer de maneira homogênea.

A-1.3.7 Colocá-los num dessecador por 24 horas, contá-los num detector "Geiger-Müller" e pesá-los.

A-1.3.8 Aconselha-se fazer sempre réplicas de cada filtro.

A-1.4 Cálculo da atividade específica

A-1.4.1 A taxa de contagem aumenta exponencialmente com a diminuição da espessura do precipitado e é extrapolada graficamente (ou por cálculos matemáticos) ao precipitado de espessura zero.

A-1.4.2 A taxa de contagem à espessura zero é multiplicada por 1.000 para corrigir a diluição da ampola. Isto representa a quantidade de atividade adicionada para cada frasco, e é usada para determinar a fração de ^{14}C fixada no claro e no escuro.

A-2 Técnica de cintilação para a determinação da atividade específica total, das ampolas de ^{14}C

A-2.1 Reagentes

A-2.1.1 Cristais de $Ba(OH)_2$.

A-2.1.2 Ampolas de ^{14}C .

A-2.1.3 Solubilizador NCS (Ref.: Nuclear Chicago Corporation) ou solubilizadores similares.

A-2.1.4 Solução cintiladora (ver Anexo B).

A-2.2 Equipamentos

A-2.2.1 Micropipeta Eppendorf, ou equipamento similar.

A-2.2.2 Cintilador líquido.

A-2.2.3 Frascos de cintilação.

A-2.2.4 Balança analítica.

A-2.3 Procedimentos

A-2.3.1 Colocar 2 mg de cristais de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (A-2.1.1) no frasco de cintilação (A-2.2.3).

A-2.3.2 Pipetar 100 ml da solução de ^{14}C com uma micropipeta (A-2.2.1) e adicionar no frasco do (A-2.3.1).

A-2.3.3 Após a dissolução dos cristais, adicionar 1 ml do solubilizador NCS (A-2.1.3).

A-2.3.4 Encher completamente o frasco cintilador com a solução cintiladora (A-2.1.4).

A-2.3.5 Contar a amostra no cintilador.

/Anexo B

RENOVAGADA

ANEXO B
CINTILAÇÃO LÍQUIDA

Essa técnica oferece várias vantagens sobre as técnicas "Geiger-Müller" normalmente usadas.

A eficiência da contagem para cada amostra é determinada numa moderna máquina; essa eficiência é determinada em poucos segundos quando a amostra é contada, e é muito superior à eficiência obtida com um contador "Geiger-Müller".

Nas análises de produtividade primária, utilizando-se como equipamento de contagem um cintilador líquido, os filtros são colocados diretamente no interior dos frascos de contagem, fechados com tampas apropriadas e contendo no interior a solução cintiladora, eliminando-se a necessidade de colocar os filtros em pranchetas, não perdendo tempo e eliminando a possibilidade de contaminação ou perda do material radioativo.

A solução cintiladora é uma mistura orgânica, composta essencialmente de dois ingredientes: o solvente (por exemplo: tolueno, dioxane, xileno, etc.), o cintilador primário (PPO) e o cintilador secundário (POPOP; dimetil-POPOP, etc.); em adição, certos solubilizadores como o NCS, Biosolv, Solueno, etc. e outros ingredientes podem também ser requeridos.

Existem numerosos métodos de preparação de soluções cintiladoras; para maiores detalhes aconselhamos consultar as referências bibliográficas contidas nesta Norma.

Uma das soluções cintiladoras frequentemente usada em tais aplicações é a baseada em dioxane (Vollenweider, 1969).

Para ensaios de rotina de material orgânico marcado com ^{14}C pode-se usar:

- a) 60 g de Naftaleno;
- b) 40 g de PPO;
- c) 0,2 g de dimetil POPOP;
- d) 1 litro de p-dioxane.

Dissolver os itens a, b, c no item d. Essa solução dissolve completamente, em minutos, os filtros à base de ester de celulose, acetato de celulose e nitrato de celulose.

ANEXO D

MODELO DE ENVELOPE PARA ARMAZENAR FILTRO COM A AMOSTRA DE 14 C

PONTO Nº: _____

AMOSTRA: _____

FILTRO Nº: _____

VOLUME: _____

DATA: _____

ANEXO E

FICHA DE LEITURA: PRODUTIVIDADE PRIMÁRIA

PROGRAMA: _____

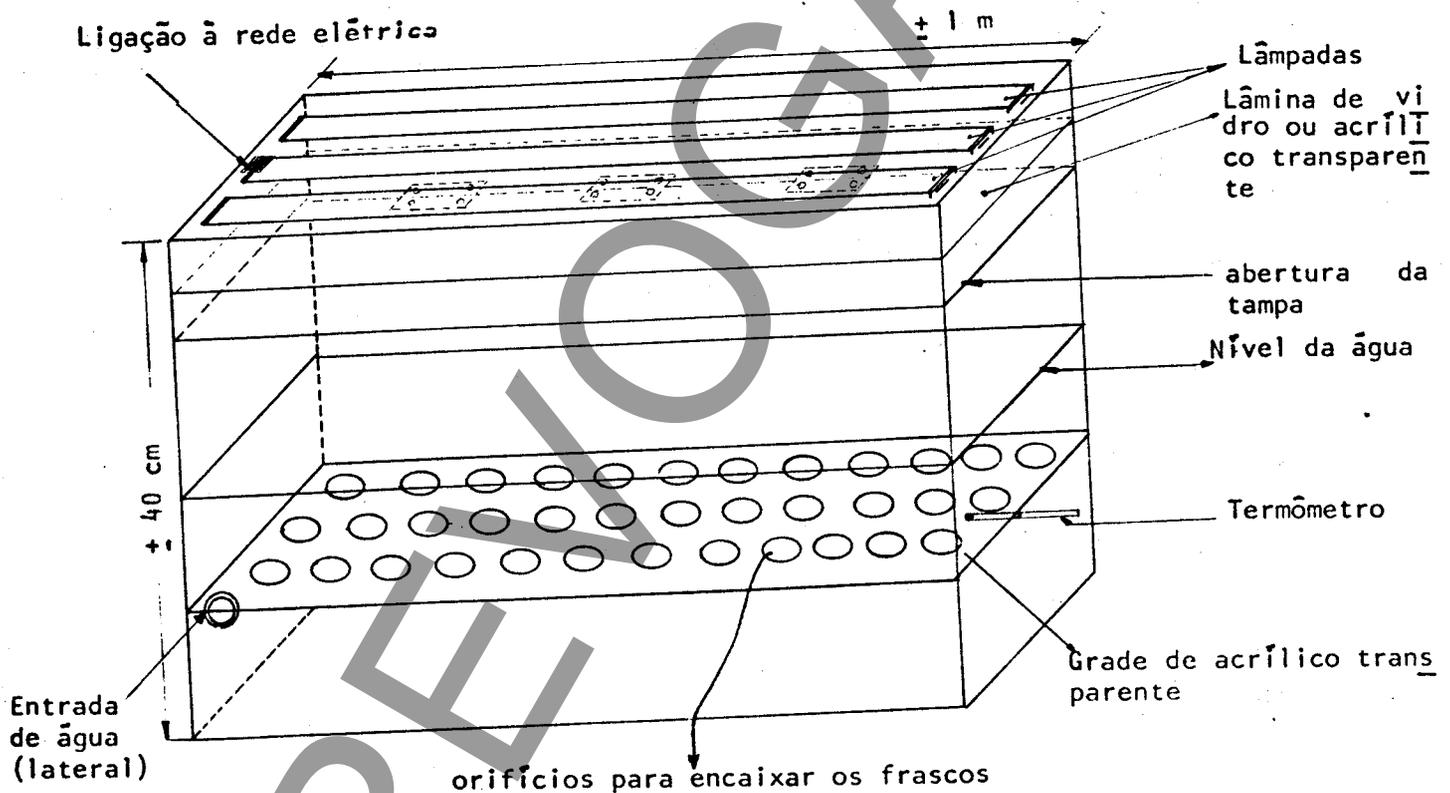
BACK - GROUND DO APARELHO	FILTRO Nº:		ATIVIDADE NOS FILTROS (cpm)		CORREÇÃO PARA O "B.G."		CORREÇÃO DA AMOSTRA	APARELHO UTILIZADO	RESPONSÁVEL PELA OPERAÇÃO
	PRETO	TRANSP.	PRETO	TRANSP.	PRETO - BG	TRANSP. - BG			

Ampolas de ¹⁴C: - Atividade total _____ cpm
 - Lote Nº _____
 - Procedência _____

ANEXO FCÂMARA INCUBADORA

A câmara incubadora consta de uma caixa de madeira ou mesmo de cimento amianto onde são colocadas as amostras, sob iluminação artificial (lâmpadas que forneçam uma intensidade luminosa de aproximadamente 3000 lux) e com água circulante, do próprio local. As lâmpadas são colocadas na tampa, e podem ser isoladas por um vidro transparente, para evitar que sejam molhadas. No fundo da caixa, pode-se montar uma grade de acrílico transparente, para encaixar os frascos, assegurando sua estabilidade.

O esquema abaixo ilustra as especificações dadas, vendo-se o interior da câmara por transparência.



ANEXO HALGUMAS NORMAS DE SEGURANÇA RELATIVAS À UTILIZAÇÃO DE MATERIAL RADIOATIVO

Para a utilização de material radioativo visando finalidades práticas, deve-se ter autorização de acordo com um número de inscrição na CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear) do Ministério das Minas e Energia, especificando o tipo de material a ser utilizado e suas finalidades.

Em estudos de produtividade primária, o radioisótopo utilizado é o ^{14}C , cuja radiação β emitida durante sua desintegração apresenta baixa energia, sendo portanto considerado como radioisótopo de radiação fraca.

Entretanto, como o radioisótopo ^{14}C possui uma meia-vida da ordem de 5.600 anos, uma série de cuidados devem ser tomados pois, apesar da longa meia-vida, certamente não deixa de ser material radioativo e, como todos eles, pode causar problemas à saúde quando não se toma as devidas precauções, apesar das baixas concentrações normalmente utilizadas em estudos de produtividade primária.

É aconselhável, por exemplo, em todas as manipulações durante as análises de produtividade primária, utilizar-se luvas cirúrgicas, aventais plásticos impermeáveis, etc.; para evitar contaminação das mãos ou da roupa, deve-se evitar o uso prolongado dessas vestimentas.

Após a manipulação, lavar, com água e sabão, as mãos, pele, unhas, etc., enxugando com toalhas, evitando esfregar, apenas comprimindo para absorver a umidade.

Não fumar, beber, ou comer, durante as manipulações com material radioativo, ou em laboratórios com substâncias radioativas.

Após as contagens dos filtros sólidos, submetê-los à ação de HCl fumegante. Esta operação deve ser feita no interior de capelas, para evitar a inalação de vapores contendo ^{14}C . Queimar os filtros e armazenar as cinzas cuidadosamente em lugares apropriados, tomando-se o cuidado de enfardá-los por compressão para reduzir o volume.

Com material líquido, adicionar líquido não contaminado para reduzir a concentração. O material assim tratado deve ser depositado em recipientes adequados em locais onde não haja perigo de quebras, vazamentos ou deterioração dos mesmos, tomando-se o cuidado de visitá-los periodicamente.

Todo material usado nos estudos de radioatividade deve ser lavado convenientemente e guardado em local adequado, devidamente etiquetado com a etiqueta interna cional de material radioativo (conforme Figura a seguir, pag.h/2).

Os depósitos de resíduos radioativos também devem conter as etiquetas indicativas.

Não se deve abandonar os resíduos nas vizinhanças; cinzas contendo material radioativo podem contaminar o ar, e ser inalado por muitas pessoas, causando-lhes risco.

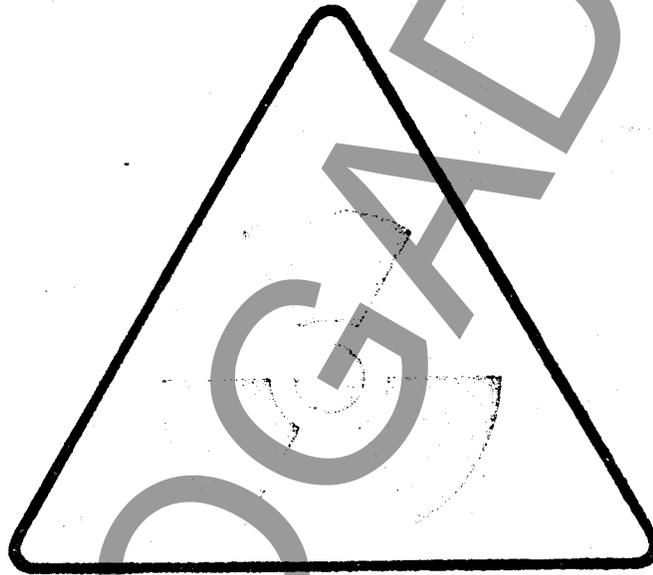
Não abandonar resíduos em rios, lagos ou mesmo no mar, evitando assim, exposição ao público.

Para maiores detalhes é aconselhável solicitar informações de segurança sobre a utilização do material radioativo diretamente à CNEN, ou ao Instituto de Energia Atômica da Universidade de São Paulo.

Endereços:

- | | |
|--|--|
| a) Comissão Nacional de Energia Nuclear
Rua dos Zaporás, 97
05434 São Paulo - SP | b) Instituto de Energia Atômica
Universidade de São Paulo
Cidade Universitária - Butantã
05508 São Paulo - SP |
|--|--|

CUIDADO!



MATERIAL RADIOATIVO

ETIQUETA INDICATIVA DE MATERIAL RADIOATIVO

ANEXO IREFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1-1 GAARDER, T. & GRAN, H.H.

Investigations of the production of plankton in Oslo Fjord.
Rapp. Proces. Verbaux, Reunions Cons. Perma. Int. Explor. Mer 42:1 - 48,
(1927).

1-2 NORMA TÉCNICA CETESB - L5.302 - Determinação de Fitoplâncton Marinho - Méto
do qualitativo e quantitativo.

1-3 NORMA TÉCNICA CETESB - L5.306 - Determinação de Pigmentos Fotossintetizantes:
clorofila-a, b e c e feofitina-a.

1-4 STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER
14 th ed., APHA, Washington, D.C., (1975).

1-5 STEEMANN NIELSEN, E.

The use of radioactive carbon (C-14) for measuring organic production in
the sea. J. Cons. Int. Explor. Mer 18:117 - 140, (1952).

1-6 STEEMANN NIELSEN, E.

Marine Photosynthesis, with special emphasis to ecological aspects. Elsevier
Oceanographic Series Nº 13, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam,
141 pp, (1975).

1-7 TUNDISI, J.G.

Produção orgânica em ecossistemas aquáticos. Ciência e Cultura 28(8): 864 -
887, (1976).

1-8 VOLLENWEIDER, R.A.

A manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments.
I.B.P. Handbook 12, Blackwell Sci., England, 225 pp, (1969).
