



NORMA TÉCNICA

L5.313

Jun/1991
15 PÁGINAS

Coleta de fitoplancton marinho e de água doce: Procedimento

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	COLETA DE FITOPLÂNCTON MARINHO E DE ÁGUA DOCE	L5.313
	Procedimento	JUN/91

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	1
2 Definições.....	1
3 Aparelhagem.....	1
4 Procedimentos de amostragem.....	2
5 Critérios de amostragem.....	6
6 Volume de amostra.....	6
7 Preservação de amostras.....	7
8 Transporte da amostra.....	8
Anexo A - Figuras.....	11
Anexo B - Referências bibliográficas.....	15

INTRODUÇÃO

A adoção de técnicas seguras de coleta constitui um dos requisitos básicos em estudos quantitativos da comunidade fitoplanctônica, sendo que não há regras gerais para a escolha, dependendo, portanto, do problema particular a ser analisado e senso crítico na adequação dos métodos.

É fundamental a obtenção de amostras representativas da comunidade, seja utilizando aparelhos sofisticados, seja adaptando dispositivos mais primitivos.

1 OBJETIVO

Esta Norma prescreve os vários métodos de coleta, preservação e estocagem de amostras de fitoplâncton marinho e de água doce, a fim de se estabelecer a metodologia mais adequada ao estudo que se deseja desenvolver.

2 DEFINIÇÕES

Os termos técnicos utilizados nesta Norma estão definidos nas normas CETESB L5.303 e L5.304.

3 APARELHAGEM

3.1 Aparelhos para amostragem de plâncton total (vide Anexo A):

- a) garrafa de Kemmerer;
- b) garrafa van Dorn;
- c) garrafa de Nansen;
- d) garrafa de Niskin;
- e) garrafa de Ruttner;
- f) garrafa de Friedinger;
- g) garrafa de Jenkin;
- h) garrafa de Zullig;
- i) bomba de sucção;
- j) balde;
- k) frascos de vidro neutro (âmbar ou transparente) de boca larga.

3.2 Aparelhos para amostragem de plâncton de rede (vide Anexo A):

- a) rede de arrasto simples;
- b) rede de Hensen;
- c) rede de Apstein;
- d) rede de Juday;
- e) rede de fechamento de Apstein;
- f) rede de fechamento de Nansen.

3.3 Material para estocagem

- a) frascos de vidro neutro, âmbar ou transparente, com capacidade de 125 mL a 1 litro, com tampa;
- b) pissetes;
- c) pipetas graduadas;
- d) funil.

3.4 Preservantes

- a) formaldeído 40%, neutralizado com bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Para neutralização, dissolve-se 5 g de bicarbonato de sódio em 1 000 mL de formol comercial (40%);
- b) solução de lugol. Para preparar essa solução, dissolve-se 50 g de cristal de iodo e 100 g de iodeto de potássio (KI) em 1 litro de água destilada, contendo 100 mL de ácido acético glacial;
- c) solução de mertiolato. Esta solução é preparada dissolvendo-se 1 g de mertiolato, 1,5 g de bórax (borato de sódio - $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_4$) e 1 mL de solução de lugol em 1 litro de água destilada;
- d) solução de Transeau. Para o preparo da solução mistura-se

6 partes de água destilada, 3 partes de álcool etílico 95% e 1 parte de formol comercial (40%) neutralizado.

4 PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM

4.1 Amostragem para análise quantitativa

Para estudo quantitativo, as amostras coletadas com rede são desaconselháveis do ponto de vista da precisão dos resultados, por mais meticulosas que sejam as coletas e as medições de velocidade, correntes, etc. Estes resultados nunca serão tão precisos como os de uma amostragem total. Para amostragem de fitoplâncton total visando uma análise quantitativa, geralmente utilizam-se garrafas adaptadas com dispositivos de fechamento. São garrafas cilíndricas que descem abertas e presas a um cabo graduado até a profundidade desejada, onde são fechadas automaticamente por meio de um peso (mensageiro), que desliza pelo cabo suporte, acionando o dispositivo de fechamento e destravando as tampas da garrafa. Existem várias garrafas desta natureza, que podem ser de vários tamanhos e materiais. As garrafas mais comumente utilizadas são as de Kemmerer, van Dorn, Niskin e Nansen.

Amostras de superfície dispensam a utilização dessas garrafas especiais, podendo-se usar baldes ou frascos de vidro. Quando a coleta é feita com balde, pode-se utilizar um funil para a transferência da amostra coletada para o frasco.

4.1.1 Garrafa de Kemmerer (ver Figura 1)

Consiste de uma garrafa cilíndrica, metálica, de construção simples e baixo custo. É geralmente encontrada em três tamanhos: 1,2, 2,0 e 3,0 litros. As válvulas de fechamento, quando acionadas, não permitem a entrada ou saída de água e, quando a garrafa está fechada, o peso total é suportado pela válvula inferior, assegurando o seu fechamento. Esse tipo de garrafa metálica deve ser protegida contra choques na extremidade do cilindro de metal, podendo causar desajustes na forma, prejudicando o fechamento normal das válvulas. A desvantagem de ser metálica reside no fato de liberar íons na amostra, podendo contaminá-la.

4.1.2 Garrafa van Dorn (ver Figura 1)

É também uma garrafa cilíndrica com fechamento acionado por mensageiro. Essa garrafa é a mais utilizada para coletas de fitoplâncton, pois apresenta algumas vantagens: as proporções do cilindro e a disposição do mecanismo de fechamento não oferecem resistência ao fluxo de água durante a descida do aparelho; além disso, a garrafa

van Dorn pode ser encontrada em diversos tamanhos, com capacidades maiores que as de Ruttner e Kemmerer.

4.1.3 Garrafa de Nansen (ver Figura 1)

A garrafa de Nansen, também cilíndrica, fecha-se por um mecanismo de reversão acionado por um mensageiro. Essa garrafa pode possuir um termômetro de reversão acoplado, que registra a temperatura da água na profundidade em que está sendo coletada a amostra. É adequada para amostragens em profundidades maiores, porém o seu volume é limitado (2 litros).

4.1.4 Garrafa de Niskin

Essa garrafa é a mais utilizada em amostragem de águas profundas. É muito semelhante à garrafa van Dorn. A vantagem é que ela pode ser lançada em série, num cabo único, para amostragem simultânea em profundidades múltiplas, com o uso de mensageiros auxiliares.

4.1.5 Garrafa de Ruttner (ver Figura 2)

A garrafa de Ruttner possui um termômetro dentro do cilindro, que registra a temperatura da amostra no momento da coleta. A desvantagem dessa garrafa é que o seu fechamento provoca turbulência na água, formando ondas de pressão que podem alterar as camadas de plâncton.

4.1.6 Garrafa de Friedinger (ver Figura 3)

A garrafa de Friedinger tem um funcionamento semelhante ao da garrafa de Ruttner, com algumas modificações. As tampas são horizontais em relação ao eixo da garrafa e o fechamento é feito "cortando" a água e evitando, conseqüentemente, a turbulência.

4.1.7 Garrafas de Jenkin e Zullig

São modificações da garrafa de Friedinger, com funcionamento semelhante e adequadas para coletas próximas ao fundo.

4.1.8 Bomba de sucção

O uso de bombas de sucção, com um tubo graduado em metros, é bastante útil na coleta rápida de um grande número de organismos, que são concentrados diretamente por filtração da água bombeada. A bomba tem a vantagem de permitir a obtenção de amostras de organismos de apenas um estrato da coluna d'água ou de coletar gradualmente os organismos, desde a superfície até a profundidade desejada. O sistema de bombeamento pode ser acoplado a sensores de profundidade, temperatura e a registradores apropriados. O uso de bombas apresenta alguns inconvenientes: quando a coluna d'água é estratificada, a mangueira precisa ser lavada entre uma amostragem e outra, para evitar contaminação de

organismos de um estrato para outro; além disso, as algas mais delicadas podem ser danificadas durante a amostragem.

- Notas:
- Para técnicas especiais de coleta, como microestratificação ou coleta em águas correntes, foi idealizada uma garrafa que trabalha na posição horizontal, cujo fechamento das tampas é feito por tração do sistema. É uma modificação da garrafa de Friedinger, sendo especialmente adaptada para amostragens estratificadas ou para coletas próximas ao fundo; é muito empregada em águas correntes e em ambientes rasos (ver Figura 4);
 - As garrafas van Dorn, de Nansen, Ruttner e Friedinger são de material inerte, adequado para a coleta de água, em geral, e de fitoplâncton para ensaios, pois não contaminam a amostra;
 - Como mensageiros, utilizam-se cilindros de chumbo, ferro ou latão, que devem pesar entre 0,5 e 1,0 kg (ver Figura 5).

4.2 Amostragem para análise qualitativa

As redes para coleta de fitoplâncton geralmente são empregadas em estudos qualitativos. A amostragem com rede seleciona o plâncton coletado, visto que todo plâncton menor que as dimensões do poro da rede é perdido. A análise se restringe, portanto, ao plâncton de dimensões maiores. Para amostragem do fitoplâncton de rede recomenda-se o uso de redes de nylon de 25 a 75 μm de porosidade. A rede de plâncton consiste basicamente de um cone truncado, com boca de 30 a 50 cm de diâmetro e um coletor na outra extremidade. Esse coletor, com a forma de um copo rosqueado, possui orifícios vedados com tecido filtrante, de malhagem igual ou menor que a da rede, para saída do excesso de água. Geralmente o tecido filtrante é feito de nylon. No aro da boca da rede são amarrados três cordéis unidos por uma argola de metal, pela qual se fixa a rede ao cabo (ver Figuras 6 e 7). Existem vários tipos de rede, que podem ser simples, como as redes de Hensen, Apstein e Juday, ou podem apresentar dispositivos de fechamento por ação de mensageiro, como as redes de fechamento de Apstein e Nansen (ver Figura 8).

- Notas:
- A principal vantagem do uso de redes de plâncton é a possibilidade de se filtrar grandes volumes de água, de modo a permitir a análise e a identificação de espécies raras, que normalmente não são detectadas em amostras de fito

- plâncton total obtidas por garrafas;
- b) A utilização de rede para coleta de fitoplâncton proporciona um agravo tanto na análise qualitativa quanto quantitativa, uma vez que os organismos enquadrados no nanoplâncton (de dimensões entre 2 e 20 μm) não são retidos em sua maioria, provocando assim uma perda da biomassa algal que pode atingir de 40 a 90% do total de clorofila ou ainda 60% da biomassa total;
- c) Em estudos mais amplos e específicos, com o objetivo de se conhecer as diversas populações, cadeia alimentar, hábitos alimentares de organismos de interesse científico-econômico, etc., é de extrema importância que o levantamento das espécies nanoplânctônicas seja realizado, uma vez que estes organismos servem de alimento para o zooplâncton e são considerados especialmente importante para a sobrevivência das larvas de invertebrados planctotróficos que habitam o fundo. Assim, a utilização de rede para coleta de amostras inviabiliza este tipo de estudo.

5 CRITÉRIOS DE AMOSTRAGEM

5.1 As amostras obtidas com rede de plâncton devem ser colocadas em frascos de vidro. Para isso, utiliza-se pissete com água do local para lavagem do copo da rede.

5.2 Quando se utiliza garrafa para coleta, as amostras são transferidas para frascos de vidro com o auxílio de um funil.

5.3 Em coletas de superfície, recolhe-se a água do manancial diretamente nos frascos de vidro, a uma profundidade de 30 cm.

5.4 Em lagoas de estabilização ou em ambientes muito poluídos, para que se evitem contaminação, o operador pode utilizar um balde para amostragem de água da superfície, que é transferida para frascos de vidro com a ajuda de um funil.

5.5 As amostras devem ser colocadas sempre em frascos devidamente etiquetados, podendo ser preservados ou encaminhados ao laboratório em seu estado natural.

6 VOLUME DE AMOSTRA

Não há uma regra quanto ao volume a ser amostrado. O volume necessário depende do número e tipos de análises a serem efetuadas. Para a maioria dos casos, principalmente em água doce, amostras de

1,0 a 2 litros são suficientes, dependendo do grau de eutrofização do ambiente. Quanto maior o grau de eutrofização, menor o volume de amostra necessário para análise.

7 PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS

7.1 A preservação é um processo que consiste na coagulação, por meios químicos, das substâncias plasmáticas celulares, de maneira a impedir deformações ou modificações de estrutura dos organismos. O preservante deve ser aplicado logo após a retirada do organismo do seu habitat natural, a fim de evitar alterações decorrentes da modificação do ambiente.

7.2 A escolha e a utilização correta dos preservantes são de fundamental importância, uma vez que estes reagentes podem interferir na contagem e classificação dos organismos, devido a alterações provocadas no meio.

7.3 Os dois reagentes mais utilizados na preservação do fitoplâncton são a solução de lugol e o formol. Aparentemente, os dois interferem ou prejudicam de igual maneira os organismos, e a adoção de um ou outro pode estar mais relacionada ao hábito do técnico que manuseia a amostra, uma vez que o lugol altera um pouco a coloração de certos organismos, requerendo, de certa forma, um hábito para melhor visualização dos mesmos.

7.4 A solução de lugol é utilizada na concentração de 1 mL/L de amostra para ambientes oligotróficos e 2 mL/L de amostra para ambientes eutróficos. As amostras preservadas com lugol podem ser estocadas por aproximadamente seis meses quando guardadas em local escuro, devido à degradação sofrida pela solução de lugol na presença da luz.

7.5 A preservação de amostras com formol é feita utilizando-se 50 mL de formaldeído 40% neutralizado por litro de amostra, onde a concentração final de formol chega a 2%. O formol deve ser acrescentado na amostra imediatamente após a coleta.

7.6 Algumas algas, principalmente as pertencentes ao grupo das cianofíceas, são caracteristicamente de superfície, devido, na maioria das vezes, à presença de pseudovacúolos no interior das células ou à própria característica morfológica, que propicia sua permanência com maior facilidade na superfície da água. Esses organismos, mesmo após preservados, tanto com formol quanto com solução de lugol, ainda permanecem na superfície. Nesse caso, somente em ambiente de água

doce, recomenda-se o emprego de detergente em uma alíquota da amostra, a uma concentração de 2,5 mL/L, para facilitar o processo de decantação.

7.7 A presença de detergente, tanto em contato com a solução de lugol quanto com o formol, produz alterações a nível de conteúdo celular, modificando o aspecto original dos organismos. Por isso, recomenda-se que amostras ricas em cianofíceas sejam preservadas com solução de mertiolato, na concentração de 36 mL/L de amostra e estocadas no escuro.

7.8 As amostras preservadas com solução de mertiolato não são estéreis, mas podem ser guardadas por um ano; após esse tempo, deve-se acrescentar formol na amostra.

7.9 Na preservação de amostras com a solução de Transeau, utiliza-se uma proporção de 1:1, ou seja, 1 parte de amostra e 1 parte de solução de Transeau.

7.10 Para manter a cor do fitoplâncton preservado deve-se estocar a amostra no escuro, ou adicionar 1 mL de solução saturada de sulfato de cobre (CuSO_4) em 1 litro de amostra.

8 TRANSPORTE DA AMOSTRA

8.1 Uma vez preservada, a amostra não necessita de maiores cuidados, devendo-se evitar apenas altas temperaturas e o excesso de luminosidade, principalmente quando o reagente utilizado para preservação for a solução de lugol.

8.2 Devido à sensibilidade de algumas algas ao meio alcalino, as amostras não preservadas devem ser acondicionadas em frascos de vidro neutro, pois morrem em poucas horas quando colocadas em vidros normais.

8.3 Se o material for transportado vivo, os frascos devem ser preenchidos com 2/3 do volume, para evitar a exaustão do oxigênio dissolvido. Não deve exceder 24 horas até o processamento da amostra ou a devida preservação.

8.4 Em casos de floração, é aconselhável que apenas 1/4 do frasco contenha amostra, a fim de aumentar a área contendo ar, uma vez que em situações com tais características são encontrados organismos em alta atividade metabólica e alguns já em estado de decomposição.

8.5 Os frascos contendo amostra viva devem ser mantidos sob refrige

ração, em caixa de isopor com gelo, para diminuir o metabolismo dos organismos e o consumo de oxigênio na ausência de luz.

/ANEXO A - FIGURAS

REVOGADA

~~REVOGADA~~

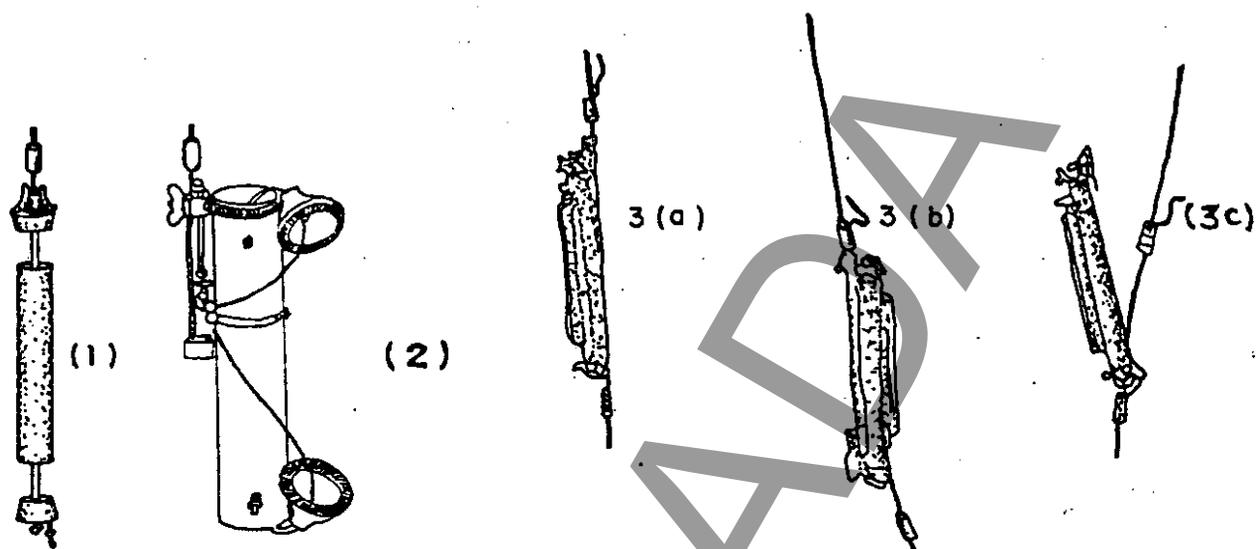
ANEXO A - FIGURAS

FIGURA 1 - Garrafa Kemmerer (1), van Dorn (2) e Nansen (3)

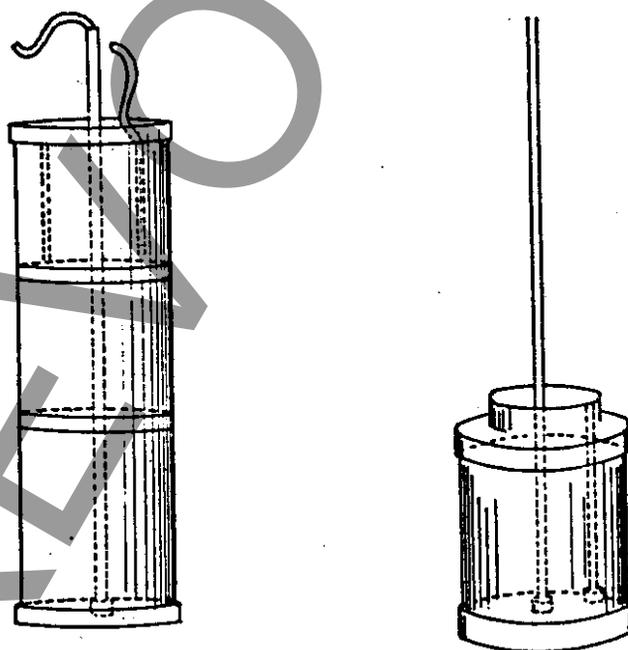


FIGURA 2 - Garrafa de Ruttner; à esquerda, aberta e à direita fechada

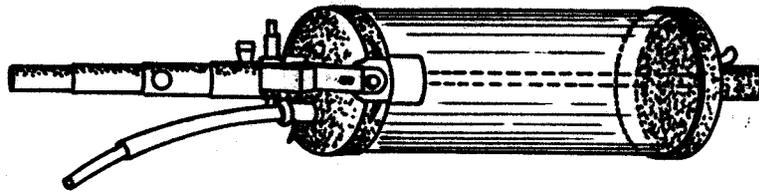


FIGURA 3 - Garrafa de Friedinger

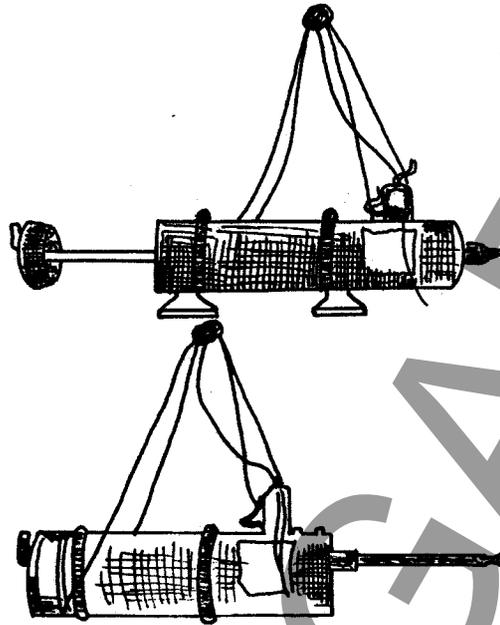


FIGURA 4 - Garrafa horizontal nas posições aberta e fechada

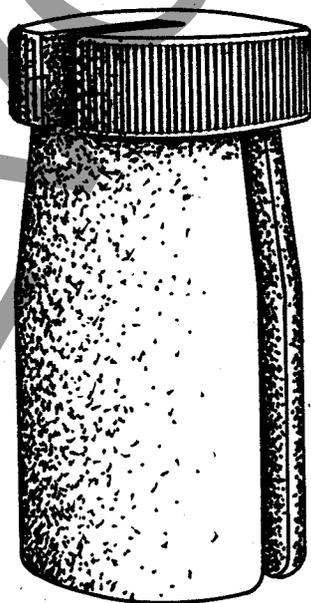


FIGURA 5 - Mensageiro (peso) para fechar os aparelhos debaixo da água

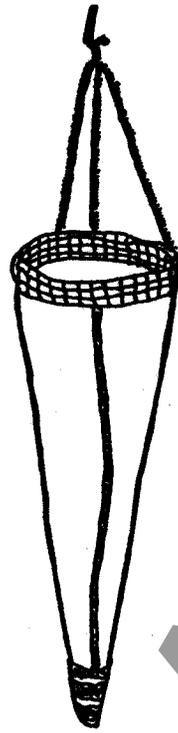


FIGURA 6 - Rede de plâncton



FIGURA 7 - Copo coletor de rede de plâncton

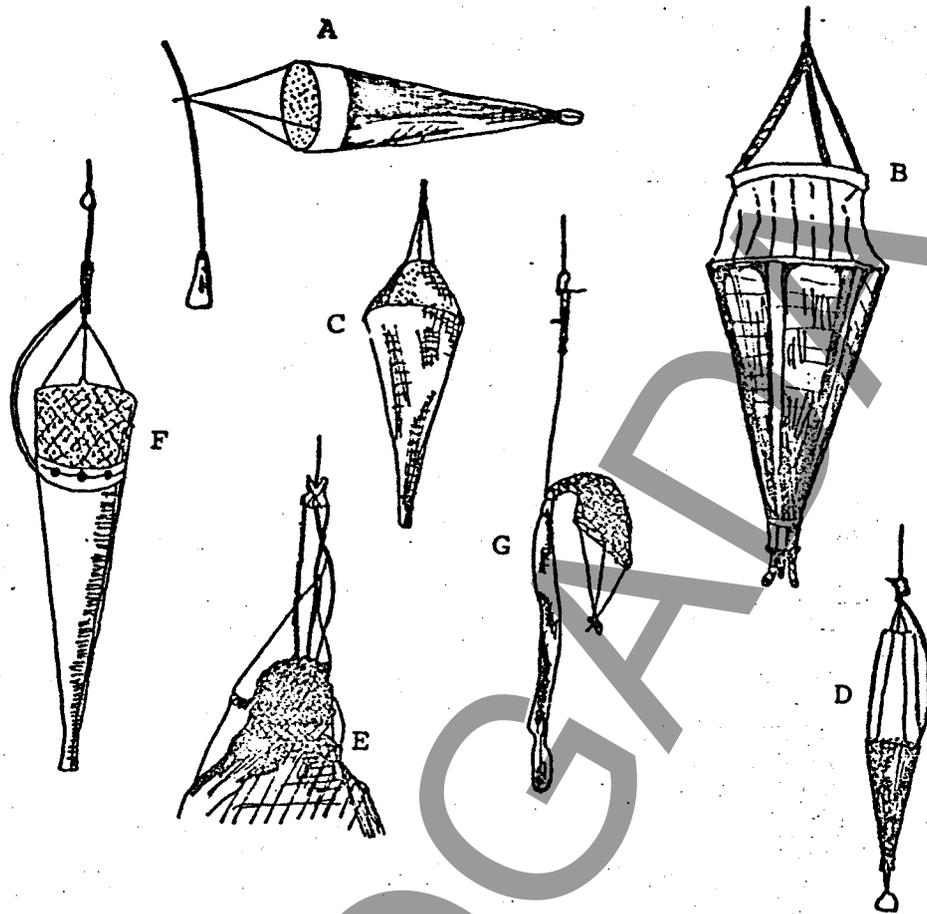


FIGURA 8 - Redes de amostragem de plâncton

- (a) Rede de arrasto cônica simples
- (b) Rede de "Hensen"
- (c) Rede de "Apstein"
- (d) Rede de "Juday"
- (e) Rede de "Apstein" com mecanismo de fechamento semi-circular
- (f) Rede de fechamento de "Nansen", aberta
- (g) Rede de fechamento de "Nansen", fechada.

ANEXO B - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- B-1 APHA, American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th edition, New York, APHA, AWWA, WPCF, 1985, 1268p.
- B-2 BRANCO, S.M. Hidrobiologia aplicada à engenharia sanitária. 3^a ed. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1986, 616p.
- B-3 CETESB, São Paulo. Determinação de fitoplâncton marinho - Métodos qualitativo e quantitativo. São Paulo, CETESB, 1978. 16p. (Norma Técnica L5.302).
- B-4 _____. São Paulo. Determinação de fitoplâncton de água doce - Métodos qualitativo e quantitativo. São Paulo, CETESB, 1978, 15p. (Norma Técnica L5.303).
- B-5 DAVIS, R.A. Principles of Oceanography. USA, Addison-Wesley Publ. Company, 1972, 434p.
- B-6 ROBERTO, S. & NAVAS-PEREIRA, D. Processamento de amostras e contagem de organismos fitoplantônicos. Ambiente, Revista CETESB de Tecnologia, 1(2): 89-94, 1987.
- B-7 SCHWOERBEL, J. Métodos de Hidrobiologia. Madrid, H. Blume Ediciones, 1975, 262p. (Version espanola: Francisco Javier Haering Perez).
- B-8 SOURNIA, A. ed. Phytoplankton Manual. Paris, UNESCO, 1978, 337p.
- B-9 WEBER, C.I. ed. Biological field and laboratory methods for measuring the quality of surface waters and effluents. Ohio, EPA - Environmental Protection Agency - Program Element 1BA027, 1973, Plankton, pg 1 a 17.