



NORMA TÉCNICA

L5.302

Fev/1992
18 PÁGINAS

Água do mar: determinação de fitoplâncton marinho: métodos qualitativo e quantitativo - 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](http://www.cetesb.sp.gov.br)

CETESB	ÁGUA DO MAR - DETERMINAÇÃO DE FITOPLÂNCTON MARINHO - MÉTODOS QUALITATIVO E QUANTITATIVO	L5.302
	Método de ensaio	Fev/92

SUMÁRIO	Pág.
Introdução.....	1
1 Objetivo.....	2
2 Definições.....	3
3 Aparelhagem.....	4
4 Execução do ensaio.....	5
5 Resultados.....	9
Anexo A - Figuras.....	13
Anexo B - Bibliografia.....	18

INTRODUÇÃO

A palavra plâncton foi introduzida por Hensen, em 1887, para distinguir todos os organismos que flutuam passivamente na água, quer sejam animais ou vegetais.

O fitoplâncton marinho é definido como plâncton vegetal, isto é, o plâncton que é hábil em fotossintetizar material orgânico a partir de materiais inorgânicos (água e dióxido de carbono), utilizando a energia luminosa.

O fitoplâncton marinho, com uma exceção, consiste de algas microscópicas, unicelulares ou reunidas em cadeias cujo tamanho varia desde alguns μm até várias centenas de μm , sendo encontrados em sua composição: clorofíceas, diatomáceas, dinoflagelados, silicoflagelados, cocolitoforídeos, cianofíceas e microflagelados. Destas, as diatomáceas representam os organismos mais importantes do plâncton marinho, pelo fato de ser o grupo mais diversificado e mais abundante na grande maioria das regiões oceânicas.

A exceção referida acima corresponde à alga parda Sargassum, macroscópica, da ordem Fucales, que, apesar de ser tipicamente bentônica, é encontrada em quantidades abundantes, flutuando em águas do Atlântico Central, entre 20° e 30° de latitude norte, numa área conhecida como Mar de Sargasso, sendo por isso considerada por grande número de autores como alga planctônica.

Tanto o fitoplâncton como as algas bentônicas constituem a fonte de produção primária de matéria orgânica no mar. A penetração de luz, entretanto, diminui rapidamente com a profundidade e, conseqüentemente, as algas bentônicas são restritas à franja litoral, enquanto o fito

plâncton acha-se distribuído sobre toda a camada superficial dos mares, excetuando-se aquelas regiões cobertas de gelo. Tais regiões, entretanto, não estão isentas da produção vegetal, porque uma abundante flora algal se desenvolve sobre o gelo; mas, de acordo com a definição de plâncton, essas algas não podem ser consideradas como fitoplâncton. De modo geral, a distribuição vertical na coluna d'água acha-se restrita ao interior da zona eufótica, onde a quantidade de luz que ali existe é suficiente para manter o processo fotossintético, ocorrendo a produção orgânica. Por esta razão, constituem os principais elementos que formam a base da rede trófica marinha.

1 OBJETIVO

1.1 Esta Norma prescreve os métodos qualitativo e quantitativo de coleta, concentração, preservação e contagem de organismos do fitoplâncton marinho, a fim de se conhecer a população existente em um ou vários habitats de determinado ecossistema, qualquer que seja seu campo de aplicação.

1.2 O conhecimento da população fitoplanctônica:

- a) aplica-se a programas de monitoramento e levantamento ecológico, permitindo conhecer sua composição sistemática, abundância, diversidade, variações sazonais e distribuição ecológica;
- b) é de grande importância nos estudos de produtividade primária;
- c) permite demonstrar o potencial orgânico local, em termos de "standing-stock", e o grau de eutroficação de um ambiente aquático;
- d) permite caracterizar massas d'água, através das chamadas espécies indicadoras de massas d'água;
- e) auxilia na elucidação de freqüentes acidentes letais que ocorrem em organismos marinhos provocados por toxinas excretadas por organismos do fitoplâncton (dinoflagelados), quando em densas populações na água do mar ou salobra;
- f) auxilia na elucidação de freqüentes acidentes de intoxicações alimentares no homem ou em outros animais terrestres e marinhos, resultantes da ingestão de peixes e principalmente moluscos que se alimentaram de dinoflagelados tóxicos e que aparentemente não são prejudicados pelos mesmos;
- g) é de grande importância em estudos de poluição orgânica ou industrial;
- h) é utilizado na interpretação de várias análises físico-químicas

cas e vice-versa;

- i) finalmente, o conhecimento dos organismos do fitoplâncton marinho, especialmente as diatomáceas, é extremamente importante em estudos ecológicos, visto serem elas a principal fonte de matéria orgânica no mar.

2 DEFINIÇÕES

Para os efeitos desta Norma são adotadas as definições de 2.1 a 2.7.

2.1 Biomassa

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

2.1.1 "Standing-stock"

Quantidade de material vivo obtido por contagem celular, expressa em termos de número de organismos presentes na amostra por unidade de volume.

2.2 Cloroplastos

Organela citoplasmática onde se localiza a clorofila.

2.3 Ecossistema ou sistema ecológico

Qualquer unidade que inclua todos os organismos em uma determinada área interagindo com o ambiente 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).

2.4 Eutroficação ou Eutrofização

Adição natural ou artificial de elementos nutritivos a um corpo d'água, que pode promover o crescimento algal.

2.5 Fitoplâncton

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 da energia luminosa, promove o processo fotossintético, responsável pela base da cadeia alimentar do meio aquático.

2.6 Fotossíntese

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

2.7 Habitat

Lugar onde um organismo vive ou onde se iria encontrá-lo.

3 APARELHAGEM

3.1 Aparelhos para amostragem

3.1.1 Redes de plâncton

Em forma de cone truncado, com boca de 30 cm de diâmetro e comprimento de 1,20 m (ou 50 cm de diâmetro de boca por 1,50 m de comprimento), confeccionadas em tecido de náilon com malha de 65 μ m (malha nº ABNT). Na extremidade inferior encaixa-se um copo que pode ser rosqueado, apresentando orifícios vedados com náilon da mesma malha da rede, para filtrar o excesso de água. À boca da rede são amarrados três cordéis, unidos por uma manilha (argola de metal) pela qual se fará a fixação da rede ao cabo que levará à profundidade desejada (ver Figura 1). A principal vantagem do emprego das redes para coletar os organismos do fitoplâncton é a possibilidade de poder-se filtrar grandes volumes de água, de maneira que mesmo os organismos presentes em pequena quantidade podem ser coletados. Porém, como as redes apresentam efeitos seletivos sobre a população, determinando a exclusão das formas que se perdem através das malhas da rede, a utilização deste método isoladamente em estudos fitoplanctônicos pode produzir uma distorção no número relativo das células grandes e pequenas.

3.1.2 Garrafas

As garrafas, além de coletarem o plâncton total presente num determinado volume de água, permitem que se determinem também estratificações ao longo da coluna d'água, pois tais garrafas podem ser lançadas a quaisquer profundidades, presas a um cabo; fecham-se automaticamente através de um dispositivo (mensageiro) enviado através do cabo, coletando assim água da profundidade desejada. As principais garrafas utilizadas nas coletas de água para estudos fitoplanctônicos são: as garrafas do tipo Van-Dorn e as do tipo Nansen.

3.1.2.1 Garrafa de Van-Dorn: de 6 ou 8 litros de capacidade (ver Figura 2).

3.1.2.2 Garrafa de Nansen: (ver Figura 3): apresenta a vantagem de possuir um termômetro de reversão, acoplado, possibilitando assim a determinação da temperatura na profundidade de coleta. A desvantagem em relação à de Van-Dorn é a de coletar pequenos volumes de água (2 litros).

3.1.3 Frascos de 250 mL de boca larga

3.1.4 Frascos de 150 mL de boca larga e tampa plástica

3.1.5 Pissetas

3.2 Aparelhos para execução do exame

3.2.1 Microscópio binocular comum.

3.2.2 Microscópio binocular invertoscópio.

3.2.3 Câmara de contagem Sedgwick-Rafter, com capacidade de 1 mL. Essas câmaras apresentam 20 mm de largura por 50 mm de comprimento e 1 mm de profundidade.

3.2.4 Câmara de contagem de invertoscópio (câmara de Utermöhl), com capacidade para 2-5 e 10 mL.

3.2.5 Provetas de 50 mL.

3.2.6 Pipetas de 5 e 10 mL.

3.2.7 Pissetas.

3.2.8 Contador manual com várias teclas.

3.2.9 Vidros pequenos.

3.2.10 Provetas de 10 mL.

4 EXECUÇÃO DO ENSAIO

4.1 Princípio do método

4.1.1 O exame de fitoplâncton marinho, dependendo dos objetivos do estudo, pode ser processado basicamente de duas maneiras:

- a) qualitativa: fornece informações sobre as espécies fitoplanc_tônicas presentes, através da diversidade e abundância relativa;
- b) quantitativa: fornece informações sobre a densidade total do fitoplâncton, através do número de organismos presentes por unidade de volume de água.

4.1.2 O método quantitativo pode englobar o qualitativo.

4.2 Reagentes

4.2.1 Formol comercial 40% neutralizado com NaHCO₃

Dissolver 5 g de NaHCO₃ em 1 litro de formol comercial 40%.

4.2.2 Solução de mertiolato

Esta solução é preparada a partir das seguintes soluções:

- a) solução I: dissolver 1 g de mertiolato (sódio etilmercúrio tiosalicilato - timerosal) em 300 mL de água destilada.
- b) solução II: dissolver 1,5 g de bórax (borato de sódio) em 300 mL de água destilada.
- c) solução III: dissolver 40 g de iodo e 60 g de iodeto de potássio em 1 litro de água destilada. Tomar 1 mL desta solução e diluir em 300 mL de água destilada.

Combinar as 3 soluções e elevar o volume a 1 litro.

4.2.3 Solução de lugol

Dissolver 10 g de iodo puro, 20 g de iodeto de potássio, 20 g de ácido acético glacial em 200 mL de água destilada. Esta solução deve ser armazenada em frascos escuros. Não se deve utilizar solução de lugol preparada há muito tempo.

4.2.4 Solução de rosa-de-bengala a 1%

Dissolver 1 g de rosa-de-bengala em 100 mL de água destilada.

4.3 Amostragem

4.3.1 As amostras para exames fitoplanctônicos podem ser coletadas com redes de náilon, ou com garrafas, quer seja o exame qualitativo ou quantitativo.

4.3.1.1 O frasco que deve receber a amostra deve ser etiquetado previamente (nº da amostra, local e data).

4.3.1.2 Usar uma ficha de coleta para registrar os dados na ocasião da amostragem: profundidade local, profundidade de coleta, hora, local, data, diâmetro da boca da rede, transparência da água, temperatura (ver Figura 4).

4.3.2 Amostras coletadas com rede de plâncton

4.3.2.1 Coleta vertical: fornece dados quantitativos, pois permite calcular o volume filtrado pela rede (área da boca da rede x profundidade de coleta). Deve-se fixar uma massa (de 1 a 5 kg) junto ao corpo da rede, para evitar que a mesma seja levada pela corrente, o que evitaria o arrasto realmente vertical. A coleta deve ser feita com o barco parado.

4.3.2.2 Coleta horizontal: fornece dados qualitativos, principalmente, pois é difícil calcular-se o volume filtrado. Deve-se fixar a massa (ver 4.3.2.1) junto à boca da rede, para mantê-la na profundidade desejada; a coleta deve ser feita com o barco em movimento, em velocidade constante (aprox. 2 milhas marítimas/hora ou 4 km/h).

4.3.2.3 O material retido no copo da rede é colocado em frascos de 250 mL (ver 3.1.3) devidamente etiquetados (ver 4.3.1.1), e preservado com formaldeído neutralizado 4%. O material retido no interior do copo deve ser vertido para um frasco de 250 mL contendo 25 mL de formaldeído neutralizado 40%, de modo que, ao se preencher com a amostra e água do local, contida em pissetas, para completar o volume, a amostra fique preservada em formaldeído neutralizado 4% (formol diluído 10 vezes).

4.3.2.4 A rede deve ser lavada ao final de cada arrasto, de fora para dentro, para evitar perda de organismos que possam ficar presos à malha, e também para evitar a contaminação das amostras seguintes com esses organismos.

4.3.3 Amostras coletadas com garrafas

4.3.3.1 É o método mais comumente usado e mais recomendado para exame quantitativo.

4.3.3.2 Pode ser utilizada na amostragem uma garrafa de Van Dorn (ver 3.1.2.1) ou de Nansen (ver 3.1.2.2).

4.3.3.3 O método consiste em se abaixar a garrafa aberta à profundidade desejada, após o que, um mensageiro é enviado pelo cabo, promovendo o fechamento da garrafa, que é trazida à superfície, contendo no seu interior água da profundidade coletada.

4.3.3.4 Uma subamostra é retirada e acondicionada em frasco de tampa plástica de 150 mL (ver 3.1.4) devidamente etiquetado (ver 4.3.1.1) e fixado com 6 a 8 gotas de lugol (ver 4.2.3), ou mertiolato (preparado conforme especificações de 4.2.2) numa concentração de 37,3 mL/L.

4.3.3.5 Preenche-se a ficha de coleta (ver Figura 4) adequadamente, conforme descrito em 4.3.1.2.

4.3.4 Destino dos frascos com amostra

Enviar os frascos devidamente etiquetados ao laboratório, juntamente com a ficha de coleta.

4.4 Procedimento

4.4.1 Preparação da amostra para ensaio

4.4.1.1 Das amostras coletadas com redes e preservadas em frascos de 250 mL, desprezar o sobrenadante e colocar a amostra em provetas de 50 mL (ver 3.2.5), para decantação, tendo-se o cuidado de lavar o frasco com formaldeído 4% para garantir que nenhum organismo fique retido no frasco.

4.4.1.2 Após 6 horas, desprezar o sobrenadante e colocar o restante em provetas de 10 mL (ver 3.2.10), tendo-se também o cuidado de lavar a proveta de 50 mL com formaldeído 4%, para não restar nenhum organismo na mesma.

4.4.1.3 Após 48 horas, ler o volume de plâncton decantado, desprezar o sobrenadante e colocar a amostra em vidros pequenos (ver 3.2.9), devidamente etiquetados, e preencher com formaldeído 4% neutralizado, contido em pissetas (ver 3.2.7). O volume da amostra nos vidros não deverá ultrapassar 1/3 do volume do frasco, para uma boa preservação. A amostra assim obtida pode ser armazenada por tempo indeterminado.

4.4.1.4 Após a obtenção do volume de plâncton, transferir a amostra concentrada dos vidros pequenos para provetas de 50 mL, e completar o volume para 50 mL, com formaldeído 4% neutralizado.

4.4.1.5 Homogeneizar a amostra com o auxílio de uma pipeta e retirar 1 mL do material, transportando-o à câmara de Sedgwick-Rafter, devidamente recoberta com lamínula, evitando-se a formação de bolhas.

4.4.1.6 Às amostras coletadas com garrafas e preservadas em frascos de 150 mL, adicionar 6-8 gotas de rosa-de-bengala (ver 4.2.4).

4.4.1.7 Homogeneizar a amostra com auxílio de uma pipeta e retirar uma subamostra de 2 mL, transferindo-a para uma câmara do microscópio invertoscópio (câmara de Utermöhl), recoberta cuidadosamente com tampa especial para a câmara, evitando-se a formação de bolhas.

4.4.1.8 A câmara de contagem contendo a subamostra deve ser deixada para sedimentação do material, no mínimo por 24 horas, em uma câmara úmida.

4.4.2 Procedimento do exame

4.4.2.1 Amostras coletadas com redes: após a preparação da amostra na câmara de Sedgwick-Rafter, essa é levada ao microscópio binocular comum e procede-se à contagem dos organismos, percorrendo-se toda a câmara. Os organismos presentes na amostra são identificados através de literatura especializada. Os gêneros e espécies observados são registrados em um contador manual de várias teclas (ver 3.2.8) e transcritos em uma ficha de leitura adequada (ver Figuras 5 e 6, no Anexo A).

4.4.2.2 Amostras coletadas com garrafas: após o período de decantação, a câmara de contagem é levada a um microscópio invertoscópio e examinada integralmente, utilizando-se ocular 10 x e objetiva 40 x. Os gêneros e espécies constatados são anotados em um contador manual de vá

rias teclas e transcritos a uma ficha de leitura (ver Figuras 5 e 6, no Anexo A). Toda identificação deve ser feita através de literatura especializada.

5 RESULTADOS

5.1 Expressão dos resultados do exame qualitativo

5.1.1 Este método é aplicável a amostras coletadas com rede (tanto em arrasto horizontal como vertical), quando se desconhece o volume de água filtrada. Os resultados obtidos são expressos qualitativamente em termos de % e/ou abundância.

5.1.2 A quantidade de organismos presentes na alíquota contida na câmara de Sedgwick-Rafter deve ser convertida para frequência de ocorrência, segundo a expressão:

$$\%S_{pi} = \frac{N_i \times 100}{N}$$

onde: S_{pi} = espécie i

N_i = número de organismos da espécie i

N , = número total de organismos na alíquota

5.2 Expressão dos resultados do exame quantitativo

Neste método, os resultados são emitidos em termos de número de organismos por unidade de volume, quer seja a amostra coletada com redes ou com garrafas.

5.2.1 Amostras coletadas com redes, em arrasto vertical

O volume de água filtrado pela rede de plâncton é obtido através de cálculos matemáticos, desde que se conheça: (1) o diâmetro da boca da rede e (2) a profundidade da coleta. Assim, a quantidade de água filtrada pela rede corresponderá a um cilindro, cujo volume é dado por:

$$V = \pi r^2 \times h$$

onde:

R = raio da circunferência (boca da rede), em m

h = profundidade da coleta, em m

Exemplo: Para uma rede com boca de 30 cm de diâmetro, que arrastou desde 8 m de profundidade até a superfície, o volume filtrado será:

$$V = \pi \times 0,15^2 \times 8$$

$$V = 3,1416 \times (0,0225) \times 8$$

$$V = 0,565 \text{ m}^3$$

A densidade, isto é o número de organismos por unidade de volume é dado por:

$$N^{\circ}/m^3 = \frac{N}{V}$$

onde:

N = número total de organismos de cada espécie ou gênero da amostra, constante da ficha de leitura (ver Figuras 5 e 6)

V = volume filtrado pela rede, em m³

Exemplo: Foram encontradas 1 200 células de Skeletonema costatum na amostra, cujo volume filtrado foi de 0,565 m³. Então:

$$N^{\circ} \text{ Skeletonema}/m^3 = \frac{1\ 200}{0,565} = 2\ 124$$

$$N^{\circ}/m^3 = 2\ 124$$

Nota: O número total de organismos na amostra é obtido através da multiplicação do número de organismos encontrados na câmara de Sedgwick-Rafter (1 mL) pelo volume da amostra de onde se retirou a alíquota. Por exemplo: a amostra foi colocada numa proveta de 50 mL, homogeneizada, e dela retirou-se 1 mL; contaram-se 200 células de Skeletonema costatum. O número de células na amostra é obtido através do cálculo:

$$N_i = n_i \times V$$

onde:

N_i = número total de organismos da espécie i na amostra

n_i = número de organismos da espécie i em 1 mL

V = volume da amostra colocada na proveta

No exemplo acima, temos:

$$N_i = 200 \times 50$$

$$N_i = 10\ 000$$

O número de células de Skeletonema costatum na amostra total é de 10 000.

5.2.2 Amostras coletadas com garrafas

Neste método, o exame fornece resultados diretos em termos de número de organismos por unidade de volume. Usando-se uma câmara de 2, 5 ou 10 mL, contada integralmente, obtém-se o número de organismos por unidade de volume através da divisão do número de organismos contados pelo volume da câmara; se a câmara utilizada for de 2 mL, o número de organismos/mL será obtido dividindo-se o número de organismos de cada espécie por 2. Se encontrarmos 6 200 células de Skeletonema costatum

numa câmara de 2 mL, então teremos $6\ 200 \pm 2$, ou seja, 3,100 células de Skeletonema costatum em 1 mL da amostra.

5.3 Expressão dos resultados dos exames

Os resultados obtidos, tanto no exame qualitativo como quantitativo, são transcritos em uma ficha individual por amostra (ver Figura 7).

/ANEXO A

ANEXO A - FIGURAS

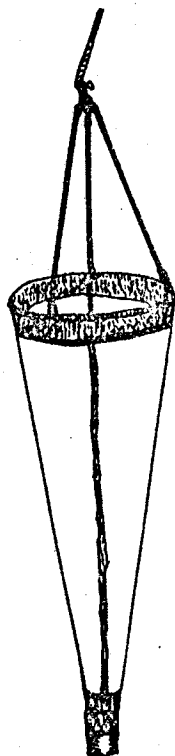


FIGURA 1 - Rede de Plâncton

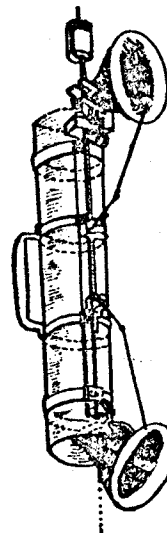


FIGURA 2 - Garrafa de Van Dorn

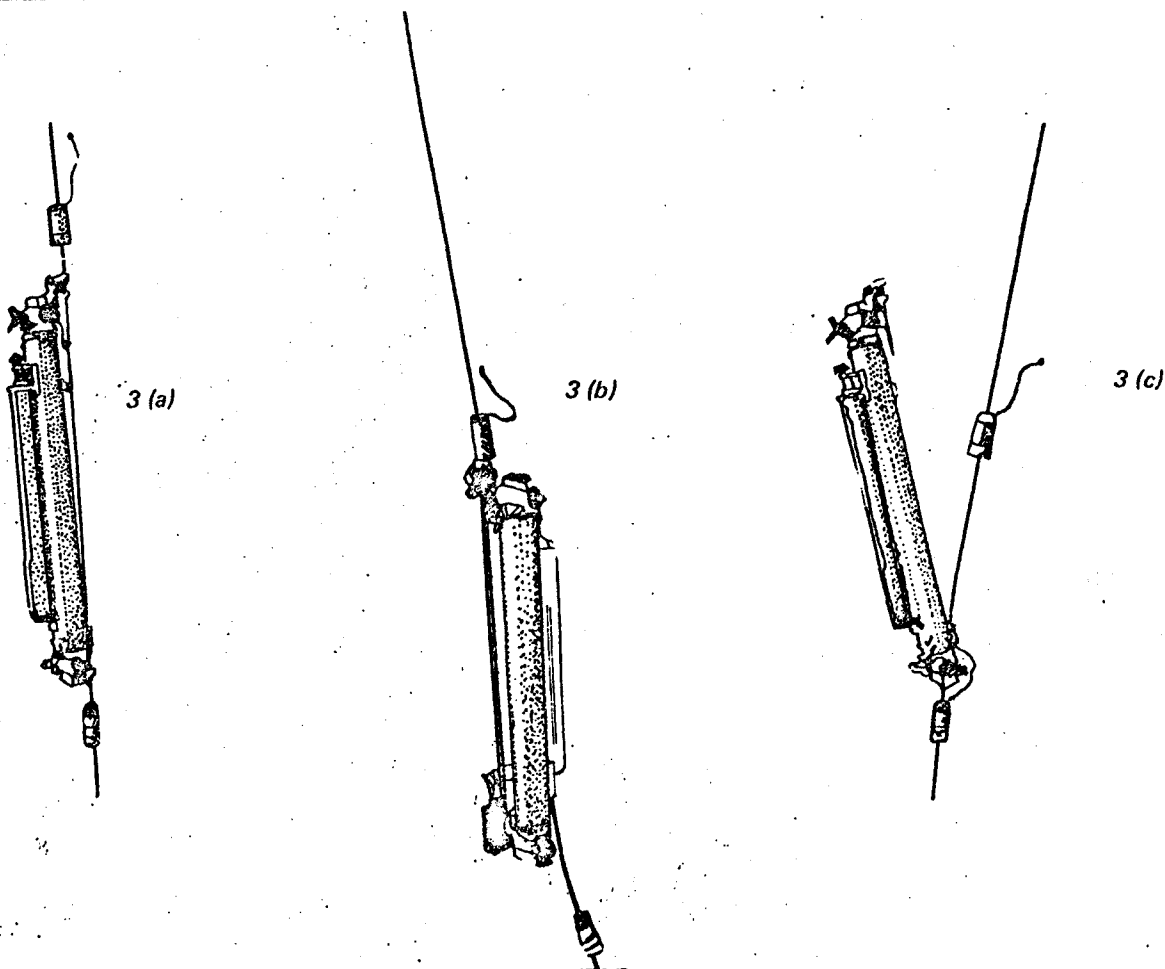



FIGURA 3 - Garrafa de Nansen



FICHA DE COLETA

INTERESSADO:		Nº DA O.S.: ORIGINAL	
Tarefa executada pela Envio de resultados para	Data da Coleta / /	Chuvas <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Lançamentos <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
Nome do Coletor		Envio de amostras para	

Local da Coleta - Descrição - Município	Nº amostra e frasco	Hora da Coleta	Temperatura (°C)		pH	Leit. água* Disco Secchi o (m)	Determinações
			Ar	Água			
Código do local							
Código do local							
Código do local							
Código do local							
Código do local							
Código do local							
Código do local							
Código do local							

Observações:

	Entrada na DOC
	Entrada no Lab.

FIGURA 4 - Modelo de ficha de coleta

FITOPLÂNCTON MARINHO

Nº amostra _____ Nº BA _____ DATA _____ FATOR _____
Origem _____ Vol. plâncton dec. (cm³) _____
Prof. coleta (m) _____ Vol. filtrado (m³) _____ Vol. plâncton (cm³/m³) _____

DIATOMÁCEAS	Nº org/m ³

FIGURA 5 - Modelo de ficha de leitura (frente)

FITOPLÂNCION MARINHO

DINOFLAGELADOS	Nº org/m³
CIANOFÍCEAS	
CLOROFÍCEAS	
DIVERSOS	

FIGURA 6 - Modelo de ficha de leitura (verso)


	
COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL	
INTERESSADO	O.S.:
MUNICÍPIO	
MANANCIAL/ORIGEM	TRATAMENTO
LOCAL DA COLETA	
DATA E HORA DA COLETA	DATA DE ENTR. NO LABOR.
CHUVAS NA ÚLTIMAS 24 hs.	TEMP. °C. AR °C
ASPECTO	ODOR
COLETOR	
FITOPLÂNCTON	Nº org/m ³ (ou Nº org/mL)
OBS:	

FIGURA 7 - Modelo de ficha para registro de resultados de exame

ANEXO B - BIBLIOGRAFIA

- B-1 HENDEY, N.I. - An Introductory Account of the Smaller Algae of British Coastal Waters. Part V. Baccillariophyceae (Diatoms). Fish Invest., Lond. Series, 4,1-317 (1964).
- B-2 VOLLENWEIDER, R.A. - A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments. IBP - Handbook nº 12; 2 ed., 225 pp. (1974).
- B-3 ANGEL, M.V. - Biological Oceanography - Methuen Studies in Science - 1 ed., 58 pp (1975).
- B-4 BOUGIS, P. - Marine Plankton Ecology. North - Holland - American Elsevier, 355 pp (1976).
- B-5 WEBER, C.I. (ed) - Biological Field and Laboratory Methods for Measuring the Quality of Surface Waters and Effluents. Doc. nº EPA-670/4-73-001 (1973).
-