



CETESB

# NORMA TÉCNICA

L5.303

4ª Edição  
Outubro 2012  
24 páginas

## Fitoplâncton de água doce: Métodos qualitativo e quantitativo

*Title in English:*

Freshwater phytoplankton: qualitative and quantitative assays

Resumo:

Descreve os principais métodos de preservação e de análises qualitativas e quantitativas para a contagem de organismos fitoplanctônicos de água doce, como também os métodos de contagem de células de cianobactérias. O estudo do fitoplâncton de água doce é uma ferramenta importante na avaliação da estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos. Além disso, a comunidade tem sido utilizada como indicadora de qualidade de água principalmente em lagos e reservatórios, e sua análise permite avaliar alterações ambientais e eventuais problemas que possam surgir quanto ao uso da água.

### Palavras chave

Análise da água, Água doce, Fitoplâncton, Cianobactérias, comunidade fitoplanctônica, algas.

### Key words

Analysis of water, Freshwater, phytoplankton, cyanobacteria, phytoplankton, algae

### 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>

### **Primeira Edição**

Dezembro/1977, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. n. 002/1978/ DDPET, de 10/01/1978.

### **Segunda Edição**

Agosto/1991, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. n. 100/91/P/ N, de 28/08/1991.

### **Terceira Edição**

Dezembro/2005, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. n. 042/2006/E, de 23/03/2006.  
Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.116, n. 74, de 20/04/2006, Poder Executivo, Seção I, pg. 27.

### **Quarta Edição**

Outubro/2012, homologada pela Decisão de Diretoria – D.D. n. 171/2013/E, de 21/05/2013. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I, v.123, n. 97, de 24/05/13, Poder Executivo, Seção I, pg. 52 a 56.

---

© CETESB 2013

É permitida a reprodução total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte. Direitos reservados de distribuição.

## **Sumário**

## **página**

01 Introdução	2
02 Objetivo	4
03 Documentos complementares	5
04 Definições	5
05 Equipamentos e reagentes	6
06 Procedimento de coleta, preservação e preparação de amostras	7
07 Execução do ensaio	8
08 Expressão dos resultados	16
09 Controle laboratorial e estocagem	16
10 Registro de dados e apresentação dos resultados	16
11 Referências básicas para identificação do fitoplâncton de água doce	17
12 Referências	18
Anexo A-Figuras dos acessórios para análise de fitoplâncton	20
Anexo B-Exemplo de ficha de análise para contagem de células de cianobactérias	22
Anexo C-Exemplo de ficha de análise de fitoplâncton	23
Anexo D-Exemplo de boletim de análise de fitoplâncton	24

## **1 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 microscópicas: clorofíceas, diatomáceas, euglenofíceas, crisofíceas, dinofíceas, xantofíceas e também cianobactérias (anteriormente denominadas cianofíceas).

O termo alga é considerado um termo popular, utilizado para designar organismos clorofilados que podem se distinguir em função de sua morfologia, reprodução, fisiologia e ecologia. Entretanto, segundo alguns autores, 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 águas ricas em nutrientes apresentam grande número de organismos, pertencentes a poucas espécies.

Além da quantidade de nutrientes presentes na 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.

Mananciais que recebem despejos domésticos, industriais ou de fontes agrícolas difusas, tendem a apresentar 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; conferir 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 consequentes problemas em estações de tratamento.

Certas espécies de algas e cianobactérias podem ainda contribuir para acelerar a corrosão de concreto submerso e 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 cianobactérias é o mais problemático do ponto de vista sanitário. São organismos procaríotos, ou seja, com estrutura celular semelhante à das bactérias, e possuem um sistema fotossintetizante semelhante ao das algas.

Esse grupo tem capacidade de crescimento nos mais diversos ambientes, porém ocorre preferencialmente em pH variando entre 6,0 e 9,0, temperatura entre 15 e 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 de animais e de seres humanos causados pela ingestão de água contaminada e pelo uso em clínicas de hemodiálise ou indústria farmacêutica de águas contendo espécies tóxicas e/ou toxinas liberadas pelas suas florações. O único relato comprovado de morte de seres humanos ocorreu em Caruaru – PE (1996), quando uma clínica de hemodiálise administrou água contaminada com cianotoxinas por via endovenosa a seus pacientes. As toxinas de cianobactérias são conhecidas como cianotoxinas, e por seu efeito podem ser classificadas como neuro ou hepatotóxicas.

Os gêneros *Dolichospermum* (antiga *Anabaena*), *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*, *Cylindrospermopsis*, entre outras, 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*, *Dolichospermum* (antiga *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 2914 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), 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 nos mananciais e controle de cianotoxinas. Também a Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005) contempla o monitoramento destes organismos.

O estudo da comunidade fitoplanctônica pode ser útil para:

- 1) Avaliar a estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos;
- 2) 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;
- 3) Identificar a origem de uma fonte de emissão ou efluente misturado na água;
- 4) 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;
- 5) 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;
- 6) Indicar a natureza, extensão e efeitos biológicos da poluição;
- 7) 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;
- 8) Explicar os mecanismos de ação dos fatores biológicos de águas residuais ou avaliar sua efetividade;
- 9) 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;
- 10) Fornecer dados sobre o estado trófico de ecossistemas aquáticos;
- 11) Acompanhar o desenvolvimento de culturas ou bioensaios com algas e cianobactérias;
- 12) Avaliar a eficiência de ações de manejo para melhoria e recuperação de corpos d'água;
- 13) Subsidiar investigação de mortandade de peixes ou outros animais.

## 2 Objetivo

Esta Norma descreve os principais métodos de preservação e de análises qualitativas e quantitativas de organismos fitoplanctônicos de água doce e também estratégias para contagem de células de cianobactérias. Além disso, indica referências para os procedimentos de coleta.

### 3 Documentos complementares

Os documentos relacionados a seguir contêm disposições que constituem fundamento para este procedimento. As edições indicadas estavam em vigor no momento desta publicação. Como toda norma está sujeita a revisões e alterações, aqueles que realizam procedimentos com base nesta, devem verificar a existência de legislação superveniente aplicável ou de edições mais recentes das normas e publicações citadas.

Na aplicação desta norma sugere-se consultar:

BRANDÃO, C. J. et al. (Org.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras:** água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011. 325 p. Disponível em:

<[http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/arquivos/20120321181900\\_Guia\\_Nacional\\_de\\_Coleta.pdf](http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/arquivos/20120321181900_Guia_Nacional_de_Coleta.pdf)>.

Acesso em: nov. 2012.

BICUDO, C.E.M.; BICUDO, D.C. (Org.). **Amostragem em limnologia.** 2.ed. São Carlos: RiMa, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União:** República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 239, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46. Disponível em:

<<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=14/12/2011&jornal=1&pagina=39&totalArquivos=192>>.

Acesso em: fev. 2013.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União:** República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 53, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63. Disponível em:

<<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=18/03/2005&jornal=1&pagina=58&totalArquivos=192>>.

Acesso em: fev. 2013.

Referências básicas para identificação do fitoplâncton de água doce, citados no final desta Norma.

### 4 Definições

Para os efeitos desta Norma, aplicam-se as seguintes definições:

#### 4.1 Biomassa

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

#### 4.2 Cianotoxinas

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

#### 4.3 Ecossistema

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

#### 4.4 Eutrofização

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

#### 4.5 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.

#### **4.6 Floração**

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

#### **4.7 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.

#### **4.8 Fotossíntese**

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

#### **4.9 Procarioto**

Célula ou organismos destituído de um núcleo distinto.

#### **4.10 Unidade Padrão de Área (UPA)**

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

## **5 Equipamentos e reagentes**

Os equipamentos, reagentes, soluções e demais materiais, necessários para a análise apresentam-se listados nos **itens 5.1 e 5.2**.

### **5.1 Equipamentos e materiais para execução da análise**

Os equipamentos e materiais utilizados na execução do ensaio encontram-se listados abaixo:

- a) Pipetas graduadas;
- b) Contador manual de uma ou de várias teclas;
- c) Retículo de Whipple (**Anexo A, figura 1**);
- d) Microscópio binocular comum, com ocular de aumento de 10X ou 12,5X e objetivas com aumento de 10X, 20X, 40X, 63X e 100X, com retículo de Whipple calibrado. Contraste de fase e epifluorescência são recomendados para auxiliar na análise;
- e) Microscópio invertido (invertoscópio), com ocular de aumento de 10X ou 12,5X e objetivas com aumento de 10X, 20X e 40X (63X e 100X são opcionais), com retículo de Whipple calibrado. Contraste de fase e epifluorescência são recomendados para auxiliar na análise;
- f) Câmaras de Utermöhl (também chamadas de câmaras de invertoscópio ou câmaras de sedimentação), com capacidade de 2, 5, 10, 25, 50 ou 100mL (**Anexo A, figuras 2 e 3**);
- g) Câmaras de Sedgwick-Rafter com capacidade de 1mL (S-R). Estas câmaras apresentam 20mm de largura por 50mm de comprimento e 1mm de profundidade (**Anexo A, figura 4**);
- h) Lâmina micrométrica (para verificar/calibrar o retículo);

- i) Lâminas e lamínulas comuns e lamínula para câmara de Utermöhl;
- j) Ficha de análise (**Anexo B e C**);
- k) Pipetas Pasteur;
- l) Câmara úmida: recipiente fechado, umidificado, utilizado para manter a umidade das câmaras de contagem;
- m) Centrífuga;
- n) Balança com precisão de 0,1g;
- o) Provetas graduadas.

## 5.2 Reagentes e Soluções

Os reagentes e soluções utilizados na execução do ensaio encontram-se listados abaixo:

- a) 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%;
- b) 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 adicionar de 0,3 a 1,0mL/100mL à amostra, dependendo da concentração de organismos;
- c) Solução Transeau: 6 partes de água, 3 partes de álcool etílico 95°GL e 1 parte de formalina; utilizada na proporção 1:1 com a amostra;
- d) Glutaraldeído neutralizado com tetraborato de sódio (20g/L) ou bicarbonato de sódio (5g/L), em concentração final de 1 a 2%;
- e) Hidróxido de Sódio (NaOH) ou de potássio (KOH) 0,1M. Utilizado na proporção de 1:1, de forma que a concentração final seja 0,05M para o KOH e 0,075M para o NaOH ;
- f) Tinta nanquim (para evidenciar bainhas e mucilagem de cianobactérias).

## 6 Procedimentos de coleta, preservação e preparação de amostras

A seguir serão apresentados os procedimentos de coleta, preservação e preparo das amostras.

### 6.1 Coleta de amostras

Para o planejamento amostral e detalhamento dos procedimentos de coleta, consultar o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (BRANDÃO et al., 2011), considerando sempre os objetivos do estudo e o tipo de análise que será realizada.

### 6.2 Preservação da amostra

Para análise quantitativa é necessário que a amostra seja preservada, uma vez que os organismos do plâncton presentes na amostra possuem mobilidade, prejudicando as contagens.

A amostra poderá ser preservada com formalina, lugol ou solução Transeau, preferencialmente até 24 horas após a coleta. 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 transportada do local de coleta ao laboratório em ambiente resfriado.

Na **tabela 1** encontram-se descritas as vantagens e desvantagens de cada conservante.

**Tabela 1 – Descrição das vantagens e desvantagens de cada conservante**

TIPO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
<b>LUGOL</b>	Preservação de flagelos e aumento do peso específico das células, facilitando a sedimentação.	Dissolve frústulas de diatomáceas mais delicadas e escamas de silicoflagelados. Não é possível utilizar a epifluorescência em amostras preservadas com lugol.
<b>FORMOL</b>	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; apresenta toxicidade à saúde humana.
<b>TRANSEAU</b>	Mantém as características das células como flagelos e plastos.	Grande volume utilizado.

Fonte: APUD CETESB (2005), modificado.

### 6.3 Cuidados na preparação da amostra

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

- É importante que a temperatura da amostra e a do ambiente estejam a mais próxima possível para evitar a formação de bolhas no preenchimento da câmara, para não haver alteração de volume;
- Homogeneizar delicadamente a amostra cerca de dez vezes para promover a distribuição uniforme dos organismos;
- O local para a preparação e sedimentação dos organismos nas câmaras de contagem deverá apresentar superfície plana e estar abrigado da luz direta, vento e movimentos.

A avaliação quantitativa de amostras para análise 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 (**item 7.2**).

É importante considerar que para cada etapa deste procedimento, diferentes fatores de conversão deverão ser calculados e aplicados para a obtenção do resultado final.

## 7 Execução do ensaio

A seguir serão apresentados os métodos de preparo da amostra para a realização do ensaio e o procedimento de análise.

### 7.1 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 na água de abastecimento ou obstrução de filtros em estações de tratamento. Nestas situações, uma avaliação qualitativa é suficiente.

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

## **7.2 Concentração das amostras**

Normalmente amostras para análise de fitoplâncton de água doce precisam ser concentradas. No entanto, isso não é necessário para amostras provenientes de ambientes que apresentam grande quantidade de algas, como lagoas de estabilização.

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

### **7.2.1 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 dos organismos na amostra, pois 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 os 45mL dos sobrenadantes. 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 2500rpm 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 do anterior, uma vez que devido ao pequeno volume utilizado pode ocorrer perda de material.

### **7.2.2 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 na câmara de sedimentação 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 de altura 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 do estabelecido para outras amostras.

Dependendo da quantidade de algas presentes na amostra, utilizam-se câmaras de volumes diferentes, sendo as mais comumente empregadas de 2,5 e 10mL (**Anexo A, figuras 2 e 3**), podendo variar até 50 ou 100mL.

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

- Colocar a câmara em posição plana e horizontal;
- Homogeneizar delicadamente a amostra preservada e retirar, com auxílio de uma pipeta, uma subamostra em quantidade suficiente para preencher o volume da câmara de Utermöhl;
- Com a lamínula, recobrir cuidadosamente a câmara, evitando a formação de bolhas;
- 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 1:** Todo o material utilizado, principalmente as câmaras de Sedgwick-Rafter e Utermöhl, deve estar limpo, isento de poeira ou gordura.

### 7.3 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 cianobactérias de pequenas dimensões de bactérias que não devem ser quantificadas na amostra, pode-se usar epifluorescência (exceto para amostras preservadas com lugol). O uso de nanquim para visualização de bainhas, principalmente para as cianobactérias, também é recomendado.

#### 7.3.1 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 (**Anexo A, figura 1**) na ocular. O retículo de Whipple deverá ser previamente calibrado, com o auxílio de um micrômetro (régua micrométrica), 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 190µm. Assim, dez quadrados que compõem o lado do retículo de Whipple equivalem a 380µm, um quadrado equivale a 38µm e a menor subdivisão do retículo, a 7,6µm.

**Observação 2:** É importante salientar que essa calibração deve ser feita para cada equipamento individualmente, e este procedimento deve ser repetido após as manutenções do microscópio.

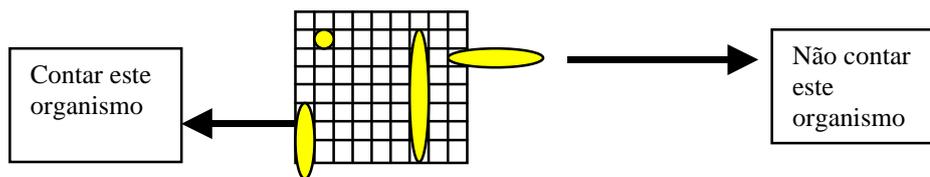
### 7.4 Método para contagem de organismos e células

Dependendo do objetivo, a análise da comunidade fitoplanctônica, pode ser realizada contando organismos e/ou células de cianobactérias.

#### 7.4.1 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: uma clorófitica com 4 células, como *Scenedesmus*, é contada como um organismo. Já para as diatomáceas, como por exemplo uma *Asterionella*, conta-se cada célula como um organismo, pois os indivíduos estão unidos apenas por espinhos ou por mucilagem.

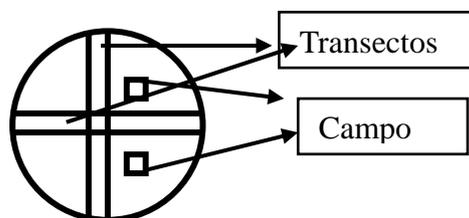
No uso do retículo para a contagem de organismos, é necessário estabelecer alguns critérios para contagem: por exemplo, quando os indivíduos não estão totalmente dentro da grade, como mostrado no esquema a seguir, pode-se estabelecer que se o organismo estiver com mais de 50% da sua área fora do retículo, este não deverá ser contado, e se estiver com mais de 50% da sua área dentro, deverá ser contado (**Figura 1**).

**Figura 1 – Exemplo de contagem de organismos no Retículo de Whipple**

Fonte: APUD CETESB (2005).

**Observação 3:** 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, como esquematizado na figura 2.

**Figura 2 – Esquema de contagem por transecto ou por campos**

Fonte: APUD CETESB (2005).

#### **7.4.2 Contagem de células de cianobactérias**

Para atender à Portaria MS nº 2914 (BRASIL, 2011) e à Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005), as estações de tratamento de água devem providenciar a contagem de células de cianobactérias para o manancial de abastecimento. A metodologia descrita nessa Norma Técnica foi desenvolvida com base nas orientações descritas em Lawton et al. (1999) e Chorus e Bartram (1999).

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

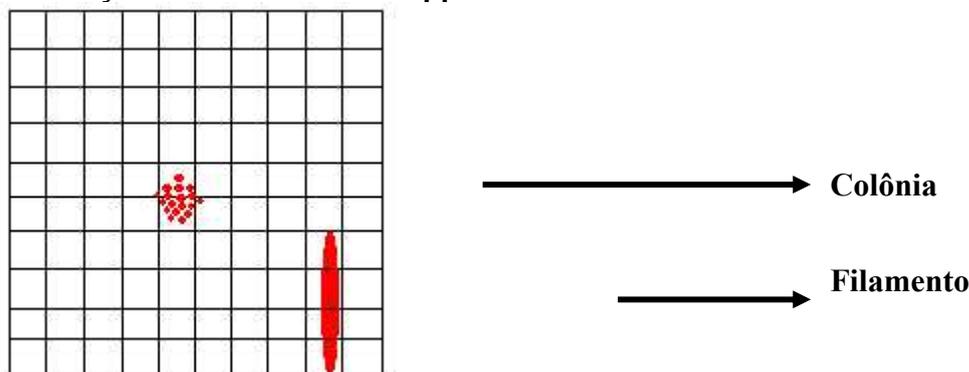
a) Formas coloniais – As células de cianobactérias coloniais são agregadas por bainhas ou mucilagens. Para facilitar a contagem de células, quando estes organismos são dominantes, por exemplo, em florações, é recomendável dissolver estas mucilagens e desmembrar as colônias em células soltas.

Uma das metodologias de dissolução da mucilagem é a hidrólise alcalina. Adiciona-se hidróxido de potássio (KOH) ou de sódio (NaOH) 0,1mol/L na amostra, na proporção de 1:1, de forma que a concentração final seja 0,05M para o KOH e 0,075M para o NaOH. Colocar a solução em estufa entre 80°C e 90°C por 30min (o recipiente deverá ser tampado para evitar a evaporação da amostra). Após este período, colocar numa câmara de Utermöhl e visualizar no microscópio invertido para confirmar se toda a mucilagem foi dissolvida. Em caso positivo, contar as células soltas. Se a mucilagem ainda não estiver completamente dissolvida ou a amostra estiver muito densa, pode ser diluída outras vezes, sempre lembrando de multiplicar o resultado da contagem pelo número de diluições para se obter a concentração final.

Após o procedimento de dissolução de mucilagem, 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 (**figura 3**) como auxiliar na contagem de células de formas coloniais. Pode-se contar quantas células ocupam cada quadrado do retículo, calcular a média dos resultados obtidos para 10 a 30 quadrados e multiplicar esse número pelo número de quadrados ocupados pela colônia.

**Figura 3 – Ilustração do Retículo de Whipple**



Fonte: APUD CETESB (2005).

b) Formas filamentosas – As cianobactérias filamentosas são formadas por células 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 cianobactérias 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 uma 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 os filamentos ocupam.

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 para auxiliar na contagem. 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.

#### **7.4.3 Cálculo para contagens realizadas em câmara de Sedgwick-Rafter**

A contagem de organismos de uma faixa horizontal corresponderá ao número de organismos contidos no retângulo cuja largura será delimitada pelo retículo de Whipple (que é igual a 380µm, ou 0,038cm, no exemplo citado no **item 7.3.1**) e o comprimento será o da própria câmara (5cm). A área desse retângulo do exemplo será igual a 0,19cm<sup>2</sup>. Como a área da câmara de Sedgwick-Rafter (**Anexo A, figura 4**) é de 10cm<sup>2</sup> e a área examinada é de 0,19cm<sup>2</sup>, dividindo-se a primeira pela segunda, obter-se-á o fator de contagem para esse microscópio.

$$F=A/a$$

(1)

Onde:

F = fator de contagem

A = área da câmara

a = área de faixa horizontal

**Observação 4:** As duas áreas devem ser expressas na mesma unidade, no caso em cm<sup>2</sup>.

Exemplo:  $F = 10 / 5 \times 0,038 = 52,63$

Para a contagem de organismos numa faixa vertical, utiliza-se o mesmo raciocínio. Neste caso, o fator de contagem é obtido com a mesma fórmula acima, porém o comprimento da câmara é 2 cm.

$$F = A/a$$

(1)

Onde:

F = fator de contagem

A = área da câmara

a = área da faixa vertical

Exemplo:  $F = 10/2 \times 0,038 = 131,58$

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 retículo de Whipple.

$$F = A/ n . a$$

(2)

Onde:

F= Fator de contagem

A = área da câmara

n = número de campos analisados

a = área do retículo de Whipple

Exemplo: Se forem analisados 10 campos, o fator será

$F = 10/10 \times (0,038)^2 = 692,52$

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 a 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 de contagem. 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.

#### 7.4.4 Cálculo para contagens realizadas 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 192 $\mu$ m de lado. A área interna de uma câmara de invertoscópio corresponde à de um círculo cujo diâmetro é igual a 2,6cm.

Portanto:

$$A = \pi R^2 \quad (3)$$

Onde:

A= área da câmara de Utermöhl

R= raio da câmara de Utermöhl

$\pi = 3,1416$

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

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

Assim:

$$F = \frac{A / a''}{v} \quad (4)$$

Onde:

F = Fator de concentração

A = área da câmara de Utermöhl = 5,3093cm<sup>2</sup>

a'' = área de um transecto = 0,0192 x 2,6 = 0,0499cm<sup>2</sup>

v= volume da câmara (mL)

Em uma câmara com volume de 2mL para a qual foram lidos dois transectos, teremos:

$a'' = 0,0499 \times 2 = 0,0998$

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

Multiplicando-se o fator assim obtido pelo número de organismos ou células encontrados nos 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 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 representa 5% do volume total da amostra. Neste caso, para o cálculo do fator, deve-se subtrair 5% do volume da câmara.

**Observação 5:** Transectos facilitam a contagem pela maior rapidez e porque minimizam os efeitos da distribuição não-homogênea dos organismos na amostra, já que raramente a sedimentação é totalmente homogênea, tendendo a concentrar organismos mais na borda ou no centro. Devem ser contados tantos transectos quanto forem necessários para se atingir o número mínimo de organismos/células, definido pelo limite de erro aceitável; portanto, devem ser calculados fatores de concentração que reflitam o número de transectos lidos.

### 7.5 Estimativa de biomassa: cálculo de UPA

Em exames de água para abastecimento, além da contagem e identificação, pode ser calculada a área de cada organismo, sendo 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  $400\mu^2$ . Por exemplo, se o quadrado menor do retículo de Whipple medisse  $20\mu$  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  $380\mu$  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. Como no exemplo acima, 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.

### 7.6 Estimativa do erro na contagem

Na determinação do número de organismos fitoplanctônicos presentes em uma amostra procura-se, para assegurar a representatividade da mesma, que o número quantificado seja o mais próximo possível do tamanho da população natural. No entanto, em função dos erros inerentes ao método, procura-se avaliar 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 para a determinação em questão. É importante verificar se a distribuição dos organismos no fundo da câmara é aleatória, e caso não seja, é preciso fazer uma nova câmara.

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

$$\text{erro de contagem (\%)} = \frac{2}{\sqrt{N}} \times 100 \% \quad (5)$$

Onde N é o número de unidades contadas (organismos ou células).

### 7.7 Identificação dos organismos fitoplanctônicos

O nível de identificação depende dos objetivos do estudo 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 demorado, até 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.

Conforme discutido no **item 6.2**, para a correta identificação de espécies de cianobactérias filamentosas, diatomáceas e flagelados, é importante a observação prévia da amostra não preservada, pois o tipo de movimento pode ter caráter taxonômico e a forma e coloração podem ser alteradas na preservação.

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

Para a identificação dos organismos deve ser utilizada bibliografia especializada (Referências básicas para identificação do fitoplâncton de água doce).

## 8 Expressão dos resultados

A seguir serão apresentadas as maneiras de expressão dos resultados.

### 8.1 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 há condições de avaliar o volume da amostra. Neste último caso a quantidade de organismos presentes na alíquota contada é convertida para frequência de ocorrência, segundo a expressão:

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

(6)

Onde:

$Sp_i$  = espécie i

$N_i$  = número de organismos da espécie i

$N$  = número total de organismos na alíquota.

### 8.2 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 pode ser expresso, além do número de organismos/mL, em número de UPA/mL ou de células, como céls./mL.

**Observação 6:** 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/ou toxicidade na água.

## 9 Controle laboratorial e estocagem

Para uma eventual necessidade de re-ensaio ou exame complementar, sugere-se que uma subamostra seja 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 que tem duração de até 3 meses. O prazo de estocagem depende do preservativo utilizado e do armazenamento adequado, e pode variar de meses (amostras preservadas com lugol) a alguns anos (amostras preservadas com formol).

## 10 Registro de dados e apresentação dos resultados

O laboratório deve manter um sistema informatizado, com possibilidade de “backup”, para fazer o registro e armazenamento dos dados analisados. O sistema deve permitir que os resultados sejam apresentados na forma de Boletim de Análise impresso ou eletrônico (**Anexo D**).

## 11 Referências básicas 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. 569 p.

DILLARD, G. E. **Common freshwater algae of the United States**: an illustrated key to the genera (excluding the diatoms). Berlin: J. Cramer, 1999. 173 p.

ETTL, H. **Xanthophyceae**. Stuttgart: Gustav Fischer, 1978. 530 p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa, band 3, teil 1)

GEITLER, L. Cyanophyceae. In: RABENHORST, L. (Ed.). **Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz**. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft, 1932. v. 14, 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. (Ed.). **The freshwater algal flora of the British isles**: an identification guide to freshwater and terrestrial algae. United Kingdom: 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: Gustav Fischer, 1997. 876p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa, band 2, teil 1).

\_\_\_\_\_. **Bacillariophyceae**: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Jena: Gustav Fischer, 1997. 610p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa, band 2, teil 2).

\_\_\_\_\_. **Bacillariophyceae**: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Stuttgart: Gustav Fischer, 1991. 576p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa, band 2, teil 3).

\_\_\_\_\_. **Bacillariophyceae**: Achnantheaceae. Stuttgart: Gustav Fischer, 1991. 437p. (Süßwasserflora von Mitteleuropa, band 2, teil 4).

\_\_\_\_\_. **Bacillariophyceae**. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2000. 311p. (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: Johnson, 1971. 5 v.

## 12 Referências

APHA; AWWA; WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater on line**. Washington, DC, c2006. Disponível em: <<http://www.standardmethods.org>>. Acesso em: fev. 2013.

ARAÚJO, A.P. Desenho 2.dwg. Dados eletrônicos (1 arquivo: 63 KB). São Paulo, 2012. AutoCAD 2004.

BICUDO, C.E.M.; BICUDO, D.C. (Org.). **Amostragem em limnologia**. 2.ed. São Carlos: RiMa, 2004.

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 do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 53, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63. Disponível em : <<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=18/03/2005&jornal=1&pagina=58&totalArquivos=192>>. Acesso em: fev. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**: República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, n.

239, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46. Disponível em:  
<<http://www.in.gov.br/visualiza/index.jsp?data=14/12/2011&jornal=1&pagina=39&totalArquivos=192>>.  
Acesso em: fev. 2013.

BRANDÃO, C. J. et al. (Org.). **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011. 325 p.  
Disponível em:  
<[http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/arquivos/20120321181900\\_Guia\\_Nacional\\_de\\_Coleta.pdf](http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/arquivos/20120321181900_Guia_Nacional_de_Coleta.pdf)>.  
Acesso em: fev. 2013.

CETESB. **L5.303: Determinação de fitoplâncton de água doce métodos qualitativo e quantitativo: método de ensaio**. São Paulo, 2005. 23 p.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, Monitoring and Management**. London: E&FN Spon, 1999. 416 p.

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, Austrália: 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.º. 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.

.../Anexo A

## Anexo A – Figuras dos acessórios para análise de fitoplâncton

Figura 1 – Retículo de Whipple.

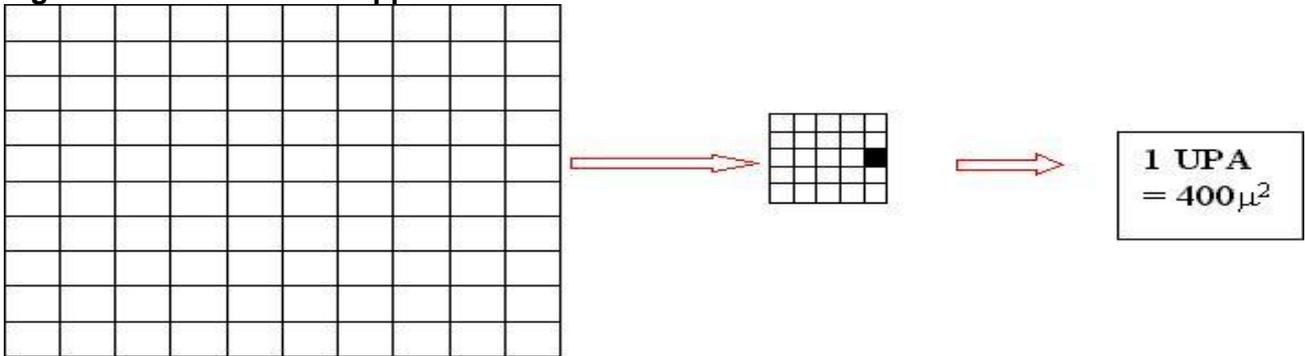
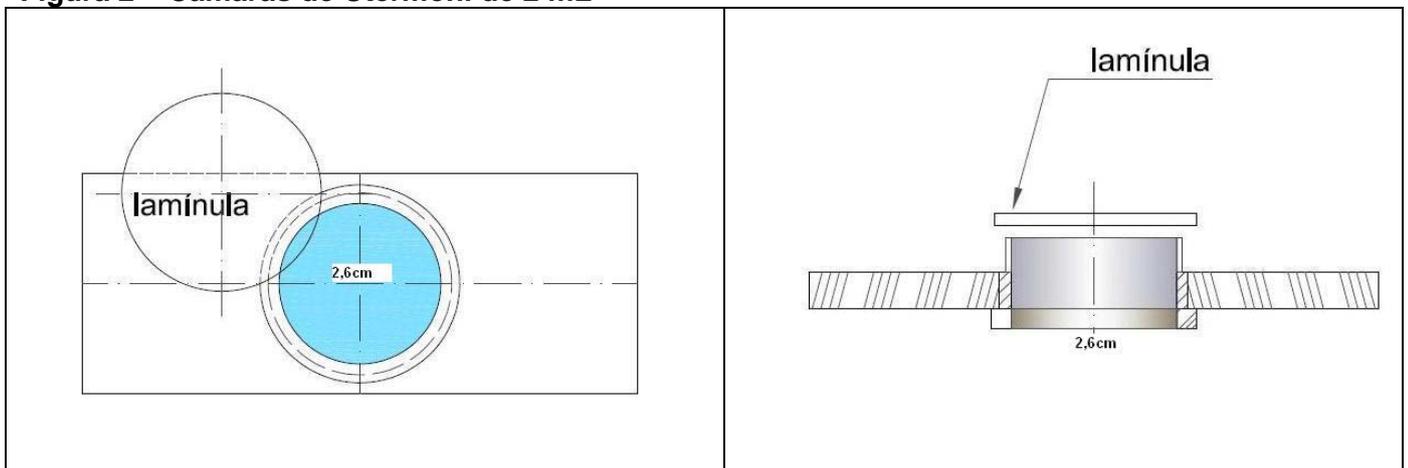


Figura 1 - Retículo de Whipple

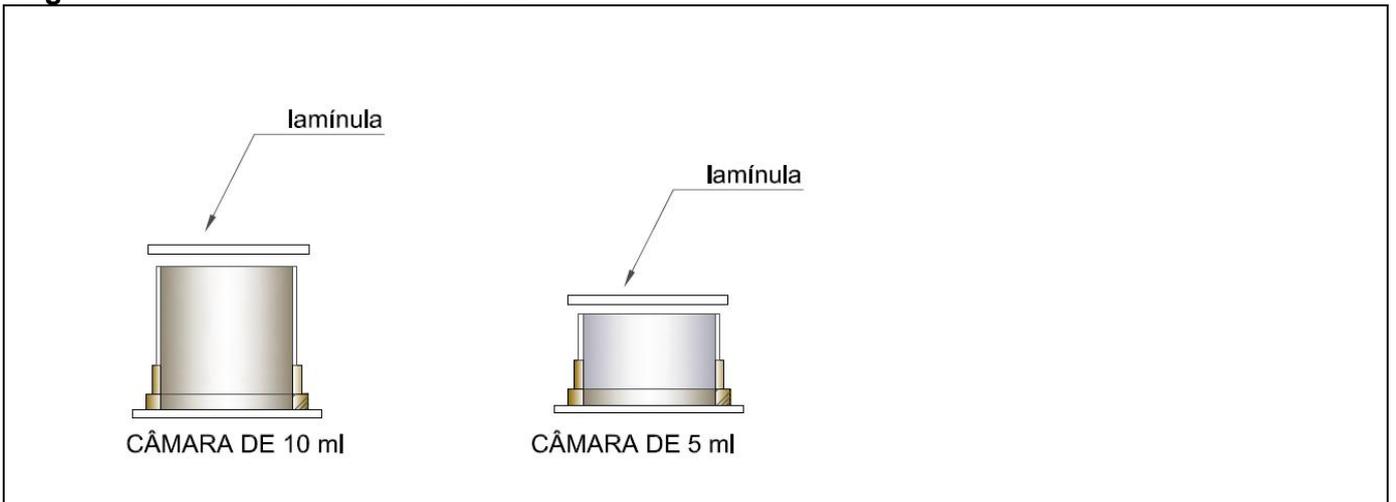
Fonte: APUD CETESB (2005).

Figura 2 – Câmaras de Utermöhl de 2 mL



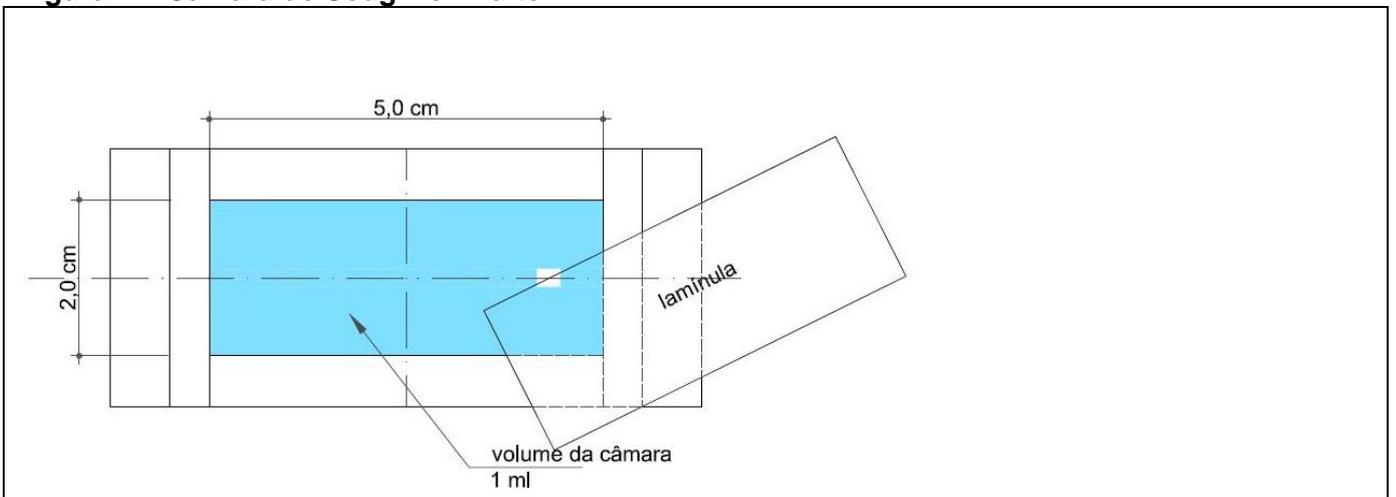
Fonte: Araujo (2012).

**Figura 3 – Câmaras de 10 mL e 5 mL**



Fonte: Araujo (2012).

**Figura 4 – Câmara de Sedgwick Rafter**



Fonte: Araujo (2012).

.../Anexo B

**Anexo B – Exemplo de ficha de análise para contagem de células de cianobactérias**

No. da amostra: _____	Data da Análise : _____
Local de Coleta: _____	Preservação: _____
Fator de Concentração (F.c): _____	Erro de Contagem: $\frac{2}{\sqrt{N}} \times 100 =$ _____
Analista: _____	

CONTROLES: Ausência de bolhas: <input type="checkbox"/>	Distribuição homogênea: <input type="checkbox"/>	Boa sedimentação: <input type="checkbox"/>
---	--	--

SEDIMENTAÇÃO Início: _____	LEITURA Campos: _____	TRANSCRIÇÃO: Data: _____
Término: _____	Transectos : _____	VERIFICAÇÃO: Data: _____

CIANOACTÉRIAS(1)	No. Céls. (2)	TOTAL (1) x (2) x F.c.
Aphanizomenon 1		
Cuspidothrix		
Aphanocapsa 1		
Aphanocapsa 2		
Dolichospermum-Anabaena 1		
Dolichospermum - Anabaena 2		
Cylindrospermopsis raciborskii		
Cylindrospermopsis/Raphidiopsis		
Geitlerinema amphibium		
Microcystis 1 <input type="checkbox"/> = 20		
Microcystis 2 <input type="checkbox"/> = 16		
Microcystis 3 <input type="checkbox"/> = 12		
Microcystis 4		
Sphaerocavum 1 <input type="checkbox"/> = 20		
Sphaerocavum 1 <input type="checkbox"/> = 16		
Sphaerocavum		

Fonte: Adaptado do formulário interno da CETESB (2012).

**Nota:** Exemplo meramente ilustrativo, os formulários internos estão sujeitos a alterações.

.../ Anexo C

**Anexo C – Exemplo de ficha de análise de fitoplâncton**

No. da amostra: _____	Data da Análise : _____
Local de Coleta: _____	Preservação: _____
Fator de Concentração (F.c): _____	Erro de Contagem: $\frac{2}{\sqrt{N}} \times 100 =$ _____
Analista: _____	

CONTROLES: Ausência de bolhas: <input type="checkbox"/>	Distribuição homogênea: <input type="checkbox"/>	Boa sedimentação: <input type="checkbox"/>
---	--	--

SEDIMENTAÇÃO Início: _____	LEITURA Campos: _____	TRANSCRIÇÃO: Data: _____
Término: _____	Transectos : _____	VERIFICAÇÃO: Data: _____

Cód. Alga	CIANOBACTÉRIAS	No. Organismos	No. UPA
	<b>DIATOMÁCEAS</b>	<b>No. Organismos</b>	<b>No. UPA</b>
	<b>CLOROFÍCEAS</b>	<b>No. Organismos</b>	<b>No. UPA</b>
	<b>FITOFLAGELADOS</b>	<b>No. Organismos</b>	<b>No. UPA</b>
	<b>DINOFLAGELADOS</b>	<b>No. Organismos</b>	<b>No. UPA</b>
	<b>XANTOFÍCEAS</b>	<b>No. Organismos</b>	<b>No. UPA</b>
	<b>Observação:</b>		

Fonte: Adaptado de formulário interno da CETESB (2012).

Nota: Exemplo meramente ilustrativo, os formulários internos estão sujeitos a alterações.

.../Anexo D

**Anexo D – Exemplo de boletim de análise de fitoplâncton**

SIGLA/ Nro./Ano

**BOLETIM DE ANÁLISES**

**FITOPLÂNCTON – CONTAGEM DE CÉLULAS DE CIANOBACTÉRIAS**

Nº Amostra: 122222  
Data Coleta: 02/02/12

Nº da O.S.: 22.222.222  
Data Entrada: 02/02/12

Descrição da amostra: B1-Água Doce  
Data Emissão: 12/02/12

**Dados do Cliente:**

Nome: CETESB

Endereço: Av. Professor Frederico Herman Jr nº345

Município: São Paulo

UF: SP

**Dados de Campo:**

Manancial: Reservatório Principal

Local: São Paulo

Coletor: José

Código Ponto:

Fator de concentração: 58.34

**RESULTADOS ANALÍTICOS**

Grupo	Identificação	NºORG/mL
<b>CIANOBACTÉRIAS</b>		
	<i>Aphanizomenon gracile</i>	58
	<i>Aphanocapsa delicatissima</i>	350
<b>CLOROFICEAS</b>		
	<i>Desmodesmus communis</i>	117
	<i>Chlorella sp.</i>	58
<b>DIATOMACEAS</b>		
	<i>Aulacoseira granulata</i>	117
<b>FITOFLAGELADOS</b>		
	<i>Trachelomonas volvocina</i>	58
TOTAL:		758

Número estimado de células de CIANOBACTÉRIAS = 820 CÉL./ML

**Observações:**

**OS DADOS DESTE BOLETIM NÃO SÃO REAIS.**

**Metodologia:**

\_\_\_\_\_  
BIÓLOGO RESPONSÁVEL

CRBio:

REG:

\_\_\_\_\_  
GERENTE DE SETOR

CRBio:

REG:

Este Boletim de Análise só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.  
Os resultados desta análise referem-se tão somente à amostra encaminhada.

Fonte: Adaptado do Boletim da CETESB (2012).

Nota: Exemplo meramente ilustrativo, os formulários internos estão sujeitos a alterações.