

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS

**CONFIABILIDADE ANALÍTICA DOS ENSAIOS QUALI-QUANTITATIVOS DE
FITOPLÂNCTON PARA O MONITORAMENTO EFICIENTE DA QUALIDADE
DOS MANANCIAIS**

CARLA CRISTINE MÜLLER

Porto Alegre

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE PESQUISAS HIDRÁULICAS

**CONFIABILIDADE ANALÍTICA DOS ENSAIOS QUALI-QUANTITATIVOS DE
FITOPLÂNCTON PARA O MONITORAMENTO EFICIENTE DA QUALIDADE
DOS MANANCIAIS**

CARLA CRISTINE MÜLLER

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Prof^o Dr. Luiz Fernando Cybis

Co-Orientadora: Prof^a Dra. Maria Teresa Raya-Rodriguez

Banca Examinadora

Prof ^a Dra. Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues	IPH/UFRGS
Prof ^a Dra. Lezilda Carvalho Torgan	Departamento de Botânica/UFRGS
Prof ^a Dra. Magali da Silva Rodrigues	Instituto Federal Rio Grande do Sul (IFRS – Campus Porto Alegre)

Porto Alegre, Abril de 2011.

AGRADECIMENTOS

À Deus. Meu guia e inspirador.

Aos meus pais, Sandra Regina Müller e Valdeni Airton Müller, principais responsáveis por essa conquista. Sem as palavras de ânimo e os conselhos para seguir em frente, eu não teria chegado ao fim.

Ao meu noivo, Matheus Schirmer Cestari, que sempre esteve ao meu lado, me dando apoio, incentivo e motivação todas as vezes que pensei em desistir dessa etapa.

À minha co-orientadora, Maria Tereza Raya-Rodriguez, que sempre foi a luz na minha jornada acadêmica. Obrigada pela acolhida, incentivo e por estar ao meu lado durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador, Luiz Fernando Cybis, pelo apoio e compreensão, mesmo nos momentos em que tudo parecia dar errado.

À minha chefe, Andréa Vidal dos Anjos e às colegas do Setor de Hidrobiologia do Laboratório Central de Águas da CORSAN, Aurea Giordani e Juliana Frizzo, pelo apoio incondicional ao desenvolvimento desse trabalho e pela ajuda em todas as etapas.

Às minhas colegas do IPH, em especial Viviane Trevisan e Maria Cristina de Almeida, pela ajuda nos momentos mais complicados do curso.

Ao CNPq pela bolsa de Doutorado concedida no início do curso.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

RESUMO

A degradação da qualidade das águas dos mananciais superficiais prejudica a sua utilização para abastecimento público. O monitoramento do fitoplâncton torna-se importante para detectar essas alterações nas águas que chegam as estações de tratamento de água. Água de má qualidade pode apresentar, entre outros aspectos, odor, sabor e excesso de organismos fitoplanctônicos que podem colmatar filtros, flotar em decantadores e produzir toxinas. As cianobactérias são organismos potenciais produtores de toxinas prejudiciais à saúde humana e animal. Nesse sentido, seu monitoramento é determinado na legislação brasileira. Este trabalho objetiva estabelecer parâmetros de garantia da qualidade analítica da contagem do fitoplâncton pelo método de Sedgwick-Rafter, através da participação em programa de comparação interlaboratorial e da validação desse método utilizando amostras não preservadas. Também pretende mostrar a importância do monitoramento do fitoplâncton em águas de abastecimento. Como forma de verificar o desempenho do Laboratório Central de Águas da Companhia Riograndense de Saneamento na análise de cianobactérias, foi avaliada a participação em Programa de Comparação Interlaboratorial, promovido pela Rede Metrológica do Rio Grande do Sul. O desempenho foi considerado satisfatório na contagem dos organismos, dentre os 30 laboratórios brasileiros participantes. No entanto, de forma geral, foram constatadas dificuldades da identificação dos organismos, sinalizando a importância de uma boa análise qualitativa. O método utilizado pelo Laboratório foi validado como exigência da norma ISO/IEC 17025, pois o método de Sedgwick-Rafter utilizado com modificação precisava ser validado. A validação foi realizada para amostras não preservadas, evidenciando não haver diferença dos resultados de análise entre amostras vivas e preservadas até três dias após a coleta, mesmo com amostra não refrigerada. O método foi considerado exato e robusto, além de terem sido calculados limite de detecção, limite de quantificação e incerteza de medição. Assegurar que o método é preciso e confiável reflete nos resultados de

monitoramentos fitoplanctônicos. Assim, durante o monitoramento mensal, realizado durante um ano, em seis mananciais utilizados para abastecimento público, detectaram-se os períodos de floração de cianobactérias, bem como os gêneros presentes. Esses dados auxiliam na avaliação da qualidade da água e na tomada de decisões em relação à melhor maneira de realizar o seu tratamento. Portanto, este trabalho mostrou a necessidade da utilização de métodos confiáveis no monitoramento fitoplanctônico. A participação em comparações interlaboratoriais é fundamental para avaliar o desempenho dos laboratórios e um meio de buscar treinamento e melhoria contínua dos analistas e dos métodos utilizados. Também ficou clara a necessidade de aperfeiçoamento na identificação dos gêneros de cianobactérias, pois a identificação incorreta pode provocar erros na quantificação e fornecer resultados que não correspondem à realidade do manancial amostrado. Além disso, evidenciou-se a importância do monitoramento do fitoplâncton na avaliação da água para abastecimento público. A correta identificação dos organismos presentes determina as ações que devem ser tomadas em relação à frequência de monitoramento ou ao processo de tratamento de água.

Palavras-chave: monitoramento, fitoplâncton, cianobactérias, método de Sedgwick-Rafter, confiabilidade analítica, validação de método.

ABSTRACT

The water quality degradation of surface waters compromise its use for public supply. Monitoring phytoplankton is important to detect these changes in waters going to water treatment plants. Poor water quality may cause, among other things, odor, taste and excess phytoplankton organisms that can bridge filters, decanters float in decanters and produce toxins. Cyanobacteria are organisms potential producers of toxins harmful to human and animal health. In this sense, their monitoring is determined by Brazilian law. This work aims to establish parameters for quality assurance of analytical phytoplankton counting by Sedgwick-Rafter method, through participation in interlaboratory comparison program and the validation of this method using samples unpreserved. Also demonstrates the importance of phytoplankton monitoring in the water supply. As a way to check the performance of the Central Laboratory for Water and Sanitation Company Riograndense analysis of cyanobacteria, it was evaluated the participation in Interlaboratory Comparison Program, sponsored by Rede Metrológica of Rio Grande do Sul. The performance was satisfactory during counting organisms among the 30 Brazilian laboratories participating. However, in general, were found difficulties in identifying, indicating the importance of a good qualitative analysis. The method was validated by the Laboratory as a requirement of ISO / IEC 17025, because the Sedgwick-Rafter method used with modification needed to be validated. The validation was performed for samples unpreserved, showing no difference between the results of analysis and samples preserved until three days after collection, even with no refrigerated sample. The method was considered accurate and robust, and have their limit of detection, limit of quantification and uncertainty calculated. Ensure that the method is accurate and reliable monitoring reflects phytoplankton results. Thus, during the monthly monitoring was conducted over a year for six water sources used for public supply, there were periods of cyanobacteria bloom, and the genera present were detected. These data help to assess the

water quality and in making decisions about the best way to accomplish water treatment. Therefore, this study showed the necessity of using reliable methods for phytoplankton monitoring. Participation in interlaboratory comparisons is essential in evaluating the performance of laboratories and a means of seeking continuous improvement and training of analysts and the methods used. Also there was a clear need for improvement in the identification cyanobacteria genera, because misidentification can cause errors in the measurement and provide results that do not correspond to the reality of the water supply. In addition, the study showed the importance of phytoplankton monitoring in the assessment of water for public supply. The correct organisms identification determines the actions to be taken in relation to frequency of monitoring or process water treatment.

Keywords: monitoring, phytoplankton, cyanobacteria, Sedgwick-Rafter method, reliability analysis, method validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Gêneros de Cianobactérias. A. <i>Anabaena</i> . B. <i>Microcystis</i> . C. <i>Planktothrix</i>	24
Figura 1.2: Gêneros de Clorofíceas. A. <i>Staurastrum</i> . B. <i>Dictyosphaerium</i> . C. <i>Spirogyra</i> . D. <i>Closterium</i>	26
Figura 1.3: Gêneros de Diatomáceas. A. <i>Asterionella</i> . B. <i>Cyclotella</i> . C. <i>Ulnaria</i> . D. <i>Fragilaria</i>	28
Figura 1.4: Gêneros de Fitoflagelados. A. <i>Synura</i> . B. <i>Eudorina</i> . C. <i>Chlamydomonas</i> . D. <i>Trachelomonas</i> . E. <i>Dinobryon</i>	31
Figura 1.5: Célula de Palmer-Maloney.....	49
Figura 1.6: Câmaras de Utermöhl.....	50
Figura 1.7: Câmara de Sedgwick-Rafter.....	53
Figura 1.8: Representação esquemática do retículo de Whipple.....	54
Figura 1.9: Representação da calibração do retículo de Whipple com o micrômetro.....	55
Figura 4.1: Localização dos municípios gaúchos aos quais pertencem os mananciais amostrados.....	133
Figura 4.2. Densidades de fitoplâncton total e cianobactérias durante o ano de 2009 nos 6 pontos de amostragem. A. Manancial B1. B. Manancial B2. C. Manancial B3. D. Manancial B4. E. Manancial C. F. Manancial R.....	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Classificação dos ambientes aquáticos de acordo com a densidade fitoplanctônica.....	12
Tabela 1.2: Parâmetros de controle, referentes às cianobactérias e cianotoxinas, estabelecidos pela Portaria nº 518 em água para consumo humano.....	39
Tabela 1.3: Classes de enquadramento das águas doces, usos preponderantes e valor máximo permitido (VMP) para clorofila e cianobactérias.....	42
Tabela 1.4: Tempos de sedimentação para as câmaras de Utermöhl.....	51
Tabela 1.5: Soluções para preservação de amostras para análise de fitoplâncton.....	52
Tabela 1.6: Tempos de sedimentação para as câmaras de Sedgwick-Rafter.....	54
Tabela 1.7: Tabela de d_2	72
Tabela 1.8: Faixa de aceitação para o R&R(%).....	74
Tabela 2.1: Resultados do teste de homogeneidade na preparação das amostras.....	87
Tabela 2.2: Resultados do teste de estabilidade na preparação das amostras.....	87
Tabela 2.3: Resultados da Rodada Piloto para contagem total de cianobactérias.....	89
Tabela 2.4: Avaliação Estatística dos Resultados enviados pelos Laboratórios participantes.....	89
Tabela 2.5: Gêneros de cianobactérias identificados pelos laboratórios participantes.....	91
Tabela 3.1: Grupos fitoplanctônicos predominantes e densidade fitoplanctônica inicial das amostras analisadas no estudo da estabilidade.....	111
Tabela 3.2: Resultados das replicatas do estudo da exatidão comparando os métodos de Sedgwick-Rafter validado e normalizado.....	112
Tabela 3.3: Resultados das amostras do estudo da precisão, em \log_{10}	113
Tabela 3.4: Resultados das replicatas do estudo da robustez avaliando a interferência dos fatores equipamento, frasco de coleta e tempo decorrido da coleta até a análise.....	114

Tabela 4.1: Caracterização dos mananciais amostrados.....	134
Tabela 4.2: Parâmetros físico-químicos analisados e métodos analíticos utilizados.....	134
Tabela 4.3: Caracterização físico-química dos mananciais estudados.....	136
Tabela 4.4: Caracterização fitoplanctônica dos mananciais estudados.....	136
Tabela 4.5: Gêneros fitoplanctônicos identificados nos mananciais estudados.....	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas

AIAG: Automotive Industry Action Group

ANOVA: Análise de Variância

APHA: American Public Health Association

ASTM: American Society for Testing and Materials

ATP: Adenosina trifosfato

AWWA: American Water Works Association

CALA: Canadian Association for Laboratory Accreditation

cél(s).mL⁻¹: célula(s) por mililitro

CEN: European Committee for Standardization

CETESB: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA: Conselho Nacional de Meio Ambiente

CV: Coeficiente de variação

DEAL/SUTRA/CORSAN: Departamento de Ensaio e Apoio Laboratorial/ Superintendência de Tratamento/Companhia Riograndense de Saneamento

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DVP-DMAE: Divisão de Pesquisa/Departamento Municipal de Água e Esgoto

EPA: Environmental Protection Agency

EPTIS: European Proficiency Testing Information System

ETA: Estação de tratamento de água

FEPAM/RS: Fundação Estadual de Proteção Ambiental/Rio Grande do Sul

FISH: Fluorescence In Situ Hybridisation

FUNASA: Fundação Nacional da Saúde

°C: graus Celsius

ILAC: International Laboratory Accreditation Cooperation

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO: International Organization for Standardization

ISO/DIS: International Organization for Standardization/Draft International Standard

ISO/TR: International Organization for Standardization/Technical Report

ISO/TS: International Organization for Standardization/ Technical Specification

k: Fator de abrangência

L: Litro

LDM: Limite de detecção do método

\log_{10} : Logaritmo de base 10

LQM: Limite de quantificação do método

mL: mililitros

mg.L^{-1} : Miligramas por litro

μm : micrômetros

mm: milímetros

mm^2 : milímetros quadrados

mm^3 : milímetros cúbicos

NBR ISO/IEC: Norma brasileira equivalente à International Standartization

Organization/International Engineering Consortium

ng.L^{-1} : nanogramas por litro

NTU: Unidade nefelométrica de turbidez

OD: Oxigênio dissolvido

OMS: Organização Mundial da Saúde

O₂: Oxigênio molecular

pH: Potencial hidrogeniônico

Pt: Platina (elemento químico)

REPE: Repetitividade

REPRO: Reprodutibilidade

RNA: Ácido ribonucléico

RMRS: Rede Metrológica do Rio Grande do Sul

RS: Rio Grande do Sul

S-R: Sedgwick-Rafter

THM: trihalometanos

VMP: Valor máximo permitido

v_{eff} : Grau de liberdade efetivo

WEF: Water Environment Federation

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1 APRESENTAÇÃO	2
1.2 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	4
1.3 HIPÓTESES DE TRABALHO	9
1.4 OBJETIVOS.....	9
<i>1.4.1 Objetivo geral.....</i>	<i>9</i>
<i>1.4.2 Objetivos específicos</i>	<i>10</i>
1.5 QUALIDADE DA ÁGUA DOS MANANCIAIS E O SANEAMENTO.....	11
1.6 PROCESSO DE EUTROFIZAÇÃO DOS AMBIENTES AQUÁTICOS.....	12
1.7 FITOPLÂNCTON EM AMBIENTES DE ÁGUA DOCE.....	14
<i>1.7.1 Condições ambientais para o seu desenvolvimento</i>	<i>14</i>
<i>1.7.2 Classificação sanitária</i>	<i>20</i>
1.7.2.1 Cianobactérias	22
1.7.2.2 Clorofíceas.....	24
1.7.2.3 Diatomáceas.....	26
1.7.2.4 Fitoflagelados	28
<i>1.7.3 Problemas para o abastecimento público.....</i>	<i>31</i>
1.7.3.1 Cianobactérias: florações e cianotoxinas	31
1.7.3.2 O caso de Caruaru.....	32
1.7.3.3 Dificuldades no tratamento de água.....	34
1.8 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA	38
1.9 TÉCNICAS PARA QUANTIFICAÇÃO DO FITOPLÂNCTON	43
<i>1.9.1 Ensaio Qualitativo.....</i>	<i>44</i>

<i>1.9.2 Concentração de amostras</i>	45
<i>1.9.3 Ensaio Quantitativo</i>	47
1.9.3.1 Métodos diretos	47
1.9.3.2 Métodos indiretos	58
1.10 GARANTIA DA QUALIDADE E CONFIABILIDADE ANALÍTICA DE RESULTADOS	63
<i>1.10.1 Detalhamento da metodologia do estudo de validação</i>	68
CAPÍTULO 2: DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE ANALÍTICA NA QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS	78
CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE SEDGWICK-RAFTER PARA A QUANTIFICAÇÃO DO FITOPLÂNCTON	73
CAPÍTULO 4: MONITORAMENTO DO FITOPLÂNCTON PARA A QUALIDADE DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO – ESTUDO DE CASO DE MANANCIAS DO RIO GRANDE DO SUL	129
CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS	151
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi desenvolvido junto ao Programa de Pós Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental do Instituto de Pesquisas Hidráulicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação do Professor Luiz Fernando Cybis e co-orientação da Professora Maria Teresa Raya-Rodriguez.

O trabalho apresentado nesta Tese de Doutorado é resultado de análise de dados e de experimentos realizados no Setor de Hidrobiologia, do Departamento de Ensaios e Apoio Laboratorial, da Superintendência de Tratamento, da Companhia Riograndense de Saneamento (DEAL/SUTRA/CORSAN). A Tese está estruturada da seguinte maneira.

Este Capítulo 1 - INTRODUÇÃO traz uma apresentação do assunto abordado, contextualizando e justificando a sua relevância. Apresenta as hipóteses e os objetivos de trabalho, além de uma revisão da literatura sobre os principais tópicos relacionados com o tema desenvolvido e um maior detalhamento de parte da metodologia de trabalho.

Nos Capítulos 2, 3 e 4 são apresentados os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento do trabalho, na forma de manuscritos e/ ou de artigos científicos. Cada trabalho contém metodologia utilizada, apresentação e discussão dos resultados obtidos, bem como as respectivas conclusões.

O Capítulo 2 traz um artigo publicado na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental (Vol. 15, nº 3, Jul/Set 2010, p. 283-290) que faz um diagnóstico a respeito da quantificação de

cianobactérias por laboratórios brasileiros, a partir da análise dos resultados de um programa de comparação interlaboratorial.

No Capítulo 3 é apresentado um manuscrito aceito para publicação na Revista DAE, cujo assunto abordado é a validação do método de contagem de Sedgwick-Rafter utilizando amostras de água sem preservação e o estabelecimento de parâmetros para controle de qualidade analítica desse ensaio.

O manuscrito apresentado no Capítulo 4, submetido à Revista Brasileira de recursos Hídricos, aborda a importância do monitoramento do fitoplâncton na determinação da qualidade da água dos mananciais utilizados para o abastecimento público.

O Capítulo 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS corresponde a discussão geral da tese, integrando os demais capítulos já apresentados. Para finalizar, no Capítulo 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS são apresentadas as referências bibliográficas citadas nos Capítulos 1 e 5, além daquelas mencionadas especificamente nos artigos técnicos apresentados nos capítulos 2, 3 e 4.

1.2 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Analisar o fitoplâncton em geral é importante para avaliar a qualidade da água. A presença e a densidade de determinados grupos fitoplanctônicos podem alterar características da água. O grupo das cianobactérias, quando em altas densidades, pode caracterizar mananciais com excesso de nutrientes, sugerindo a entrada de despejos industriais, domésticos e/ou agrícolas nestas águas, além da preocupação com as toxinas. Outros organismos, como as diatomáceas, podem conferir odor à água e também colmatar filtros das estações de tratamento de água (DI BERNARDO, 1995).

A resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente 357/2005, dispõe sobre a classificação dos corpos de água e sobre as diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências (CONAMA, 2005). A análise de fitoplâncton, representada pela clorofila *a* e pela contagem celular de cianobactérias, está incluída na lista de parâmetros utilizados para determinar as classes de enquadramento dos corpos hídricos.

O aumento da frequência de florações de cianobactérias em mananciais utilizados para abastecimento público é uma preocupação mundial. As florações podem ser caracterizadas como multiplicação e acumulação de células durante horas ao longo do dia ou podendo permanecer por vários meses (CEBALLOS; AZEVEDO; BENDATE, 2006). Geralmente, ocorrem quando os mananciais apresentam-se eutrofizados ou em processo de eutrofização. Os nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, proporcionam um rápido crescimento das cianobactérias.

As cianobactérias (também denominadas algas azuis ou cianofíceas) são organismos procarióticos, que apresentam estrutura celular bacteriana e nutrição proveniente do processo de fotossíntese. Pertencem à comunidade fitoplanctônica dos ambientes aquáticos e, quando formam florações, são organismos dominantes. Podem produzir metabólitos tóxicos (cianotoxinas), desequilibrando a cadeia trófica. A maior preocupação com estes organismos está na sua capacidade de produzir toxinas, pois podem causar prejuízos à saúde humana pelo consumo de água contaminada.

A maioria das Estações de Tratamento de Água (ETAs) brasileiras realiza o tratamento da água através do processo convencional. Já é consenso que esse processo, constituído pelas etapas de coagulação, floculação, sedimentação, filtração e cloração, é eficaz na remoção dos organismos pertencentes ao fitoplâncton como um todo, sendo capaz de remover as toxinas intracelulares das cianobactérias. No entanto, este processo não remove as toxinas dissolvidas na água, de acordo com os limites previstos na legislação. A alternativa adotada pelas ETAs na remoção das cianotoxinas dissolvidas na água é a inclusão da etapa de adsorção ao processo convencional de tratamento. Nesta etapa é utilizado, predominantemente, o carvão ativado em pó, como também pode ser usado o granular.

A preocupação com as toxinas levou a inclusão da análise de algumas cianotoxinas e do número de células de cianobactérias na portaria brasileira de potabilidade, a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde, de 2004, que “estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências” (BRASIL, 2004a). Nela estão estabelecidos pontos de amostragem, tanto de água bruta, quanto de água tratada, frequências de amostragem, bem

como limites de concentração de cianotoxinas na água tratada e limite de densidade celular de cianobactérias na água bruta.

Visando atender as exigências da legislação vigente, em relação ao parâmetro número de células de cianobactérias, os laboratórios que realizam identificação e contagem de fitoplâncton devem ter profissionais capacitados e métodos de ensaio eficazes, uma vez que a frequência de monitoramento e as ações que devem ser tomadas quanto à análise de cianotoxinas, e no processo de tratamento da água, dependem da correta identificação e contagem das cianobactérias.

A contagem celular dos organismos fitoplanctônicos é uma análise que requer também profissionais especializados e treinados, referências bibliográficas específicas para identificação e microscópio adequado para realização das contagens, sendo uma análise laboriosa. As técnicas mais empregadas pelos especialistas são as de contagem em microscópio óptico comum, utilizando câmaras de Sedgwick-Rafter e de contagem em microscópio invertido, utilizando câmaras de Utermöhl. Embora ambas as técnicas sejam amplamente aceitas, a técnica de Sedgwick-Rafter está detalhadamente descrita no *Standard Methods of Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 2005), utilizando amostras preservadas, ou seja, o ensaio não é realizado em amostras *in natura* com células vivas. No entanto, não são especificados parâmetros de garantia da qualidade dos ensaios, nem comparações dos resultados entre as técnicas.

A estimativa indireta do número desses organismos, a partir da biomassa total do fitoplâncton, é realizada através da determinação de pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a*). Esta técnica é amplamente utilizada e, inclusive, consta na legislação, como mencionado anteriormente.

Estes métodos não reduzem o tempo de análise, porém, não requerem analistas com formação especializada como exige a contagem ao microscópio. A análise de clorofila *a* pode ser realizada por diferentes métodos, destacando-se espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia líquida.

Assim, parâmetros que assegurem a qualidade e confiabilidade analíticas dessas técnicas de contagem tornam-se de grande valia para os usuários desses métodos. Estes parâmetros são essenciais para a acreditação de laboratórios a normas de qualidade laboratoriais, como a NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a) e ao cadastramento de laboratórios junto a órgãos ambientais fiscalizadores, conforme a Portaria nº 035/2009 (FEPAM, 2009). A primeira norma fornece os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração e a segunda, dispõe sobre normas para Cadastramento de Laboratórios de Análises Ambientais junto à da Fundação Estadual de Proteção Ambiental do Estado do Rio Grande do Sul (FEPAM/RS).

A contagem do fitoplâncton utilizando amostras vivas, através da técnica de Sedgwick-Rafter, representa economia, tanto de tempo quanto de custo de análise. O tempo de sedimentação da amostra na câmara é de 15 minutos, mais rápido quando comparado às câmaras de Utermöhl, que necessitam de algumas horas até alguns dias de sedimentação, dependendo da altura da câmara. Além disso, possibilita análise de grande número de amostras em um mesmo dia, o que corresponde à rotina de muitos laboratórios de análises e de empresas de saneamento. Em relação aos impactos ambientais relacionados ao descarte dos rejeitos laboratoriais com preservantes, por exemplo, o Lugol, o uso de amostras *in natura* proporciona um processo laboratorial mais limpo.

No entanto, para atender às normas de qualidade analítica, esse método deve ser validado, isto é, confirmar por exame e fornecimento de evidência objetiva de que método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados (ABNT, 2005a; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Isso porque a ISO/IEC 17025 exige que os métodos analíticos utilizados sejam normalizados. Alternativamente, permite que métodos desenvolvidos ou adotados pelo laboratório, métodos normalizados usados fora do escopo, ampliações e modificações de métodos normalizados, se apropriados para o uso, sejam utilizados, desde que estejam validados (ABNT, 2005a).

Nesse contexto, este trabalho pretende avaliar os ensaios quali-quantitativos do fitoplâncton em relação à qualidade analítica. Para isso, os resultados finais de um programa de comparação interlaboratorial (também denominado Ensaio de Proficiência) na quantificação de cianobactérias serão analisados criticamente. Também será realizada a validação do método de contagem do fitoplâncton de água doce utilizando câmaras de Sedgwick-Rafter com amostras vivas, com vistas a garantir a confiabilidade analítica dos resultados. Além disso, pretende demonstrar a importância do monitoramento de algas, realizado através desse método, na água para consumo humano, principalmente, com vistas àquelas potencialmente tóxicas (como muitos gêneros de cianobactérias) .

1.3 HIPÓTESES DE TRABALHO

A proposta de trabalho está baseada nas seguintes hipóteses:

“Os laboratórios brasileiros realizam a análise quali-quantitativa do fitoplâncton (especificamente em relação ao grupo das cianobactérias) de forma adequada e com resultados satisfatórios?”

“A validação do método de Sedgwick-Rafter utilizando amostras *in natura* poderá assegurar a confiabilidade analítica dos resultados de monitoramentos quali-quantitativos de fitoplâncton?”

“A análise quali-quantitativa do fitoplâncton é uma ferramenta eficiente no monitoramento da qualidade da água utilizada para abastecimento público?”

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Baseado na freqüente ocorrência de florações de cianobactérias com potencial para produção de toxinas em mananciais utilizados para abastecimento público e buscando fornecer maiores conhecimentos das técnicas de contagem do fitoplâncton, o presente trabalho tem como

objetivo realizar uma avaliação da análise quali-quantitativa do fitoplâncton em termos de confiabilidade analítica e de sua relevância no monitoramento da qualidade da água utilizada para abastecimento.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1) Diagnosticar a realidade dos laboratórios brasileiros que fazem análise de fitoplâncton através da participação em Programa de Ensaios de Proficiência em Cianobactérias promovido pela Rede Metrológica do Rio Grande do Sul (RMRS);
- 2) Estabelecer parâmetros de garantia da qualidade e confiabilidade analíticas para os ensaios de contagem de fitoplâncton através do método de Sedgwick-Rafter em amostras não preservadas;
- 3) Avaliar garantia da qualidade e confiabilidade analíticas para os ensaios qualitativos de cianobactérias;
- 4) Demonstrar a importância da análise de fitoplâncton para a qualidade da água distribuída a população, através do monitoramento desses organismos nos mananciais de superfície no Rio Grande do Sul.

1.5 Qualidade da água dos mananciais e o Saneamento

Uma definição clássica de Saneamento é “o conjunto de medidas visando a preservar ou a modificar as condições do meio ambiente, com a finalidade de prevenir doenças e promover a saúde” (MOTA, 2003). Assim, o Saneamento tem por objetivo proporcionar à população humana um ambiente com condições adequadas para garantir sua saúde. Dentre as diversas atividades do Saneamento, destacam-se o abastecimento de água; coleta, tratamento e destinação de esgotos domésticos e industriais; gerenciamento de resíduos sólidos; drenagem de águas pluviais e controle da poluição ambiental. O crescimento da população urbana, acompanhado do desenvolvimento industrial e agrícola exige ações de controle da poluição ambiental, principalmente, nos corpos hídricos.

A busca pela melhoria da saúde e da qualidade de vida das populações implica no planejamento de ações voltadas ao saneamento básico e ambiental. Essas ações devem estar relacionadas com a área de drenagem das bacias hidrográficas. Todos os impactos incidentes nestas áreas são refletidos diretamente na qualidade da água (BOLLMANN *et al.*, 2005).

Dentre os usos múltiplos para os corpos de água, em situação de escassez, a prioridade é a sua utilização para abastecimento público e dessedentação de animais (BRASIL, 1997). No entanto, grande parte dos mananciais brasileiros com essa finalidade não tem recebido a atenção adequada. Como consequência, apresentam uma crescente e progressiva deterioração da qualidade das águas. A demanda de consumo de água tem aumentado significativamente e a disponibilidade hídrica em condições de utilização para fornecimento à população não tem crescido na mesma proporção (CARNEIRO *et al.*, 2005).

Para operar um sistema de abastecimento de água é necessário conhecer as relações causa-efeito que influenciam na qualidade da água, especialmente as relacionadas à eutrofização e ao desenvolvimento de algas (CARNEIRO, *et al.*, 2005). Há necessidade de controlar o processo de eutrofização, como forma de garantir os usos múltiplos dos corpos hídricos (dentre eles, navegação, recreação, abastecimento público, irrigação). A degradação, gerada pela eutrofização, pode comprometer ou mesmo inviabilizar seu uso para abastecimento ou para outras atividades humanas, como também, para a preservação das comunidades aquáticas (XAVIER *et al.*, 2005).

1.6 Processo de eutrofização dos ambientes aquáticos

O aumento da concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, nos ecossistemas aquáticos, tem como consequência o aumento de sua produtividade e caracteriza-se como processo de *eutrofização*. Como decorrência desse processo, de acordo com Esteves (1998), o ecossistema aquático passa da condição oligotrófica ou mesotrófica para eutrófico ou mesmo hipereutrófico (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Classificação dos ambientes aquáticos de acordo com a densidade fitoplanctônica.

CLASSIFICAÇÃO	Nº células . mL ⁻¹
Oligotrófico	10 - 10 ²
Eutrófico	10 ² - 10 ⁴
Hipereutrófico e cultivos	10 ⁴ - 10 ⁶
Cultivos em condições especiais	10 ⁶ - 10 ⁸

Fonte: Margalef, 1983.

A eutrofização pode ser natural ou artificial. Quando natural, é um processo lento e contínuo que resulta do aporte de nutrientes trazidos pelas chuvas e pelas águas superficiais que erodem e lavam a superfície terrestre. A eutrofização natural corresponde ao que poderia ser chamado de “envelhecimento natural” do ecossistema aquático. Quando ocorre artificialmente, ou seja, quando é induzida pelo homem, a eutrofização é denominada artificial, cultural ou antrópica. Neste caso, os nutrientes podem ter diferentes origens, como efluentes domésticos, efluentes industriais e/ou atividades agrícolas. Este tipo de eutrofização é responsável pelo “envelhecimento precoce” dos ecossistemas. Está relacionada com o aumento da população, da industrialização, do uso de fertilizantes químicos na agricultura e com a produção de produtos de limpeza contendo compostos polifosfatados. Esses fatores resultam na liberação dos nutrientes fósforo e nitrogênio que são estimuladores da eutrofização. A eutrofização artificial é um processo dinâmico, ocorrendo mudanças qualitativas e quantitativas nas comunidades aquáticas, nas condições físico-químicas da água e na produtividade do ecossistema, podendo ser considerada uma forma de poluição aquática (ESTEVEVES, 1998; FUNASA, 2003; XAVIER, *et al.*, 2005).

Dentre as mudanças nas comunidades aquáticas, uma rápida resposta à eutrofização é dada pela comunidade fitoplanctônica que passa a apresentar uma redução na diversidade de espécies, porém com aumento considerável da biomassa das espécies presentes. Nesses ambientes, tem sido observado um aumento da dominância de espécies de cianobactérias, principalmente próximo aos centros urbanos. A ocorrência de florações nos ambientes eutrofizados é uma das características mais evidentes desse processo e ocorrem com maior frequência nos meses mais quentes do ano (ESTEVEVES, 1998; XAVIER, *et al.*, 2005).

Em função da eutrofização, muitos lagos em todo o mundo já se encontram seriamente afetados. Reservatórios e rios também estão ameaçados. Esses ambientes perdem sua qualidade cênica, seu potencial recreacional e, de forma geral, seu valor econômico, tanto para o uso no abastecimento público, quanto para o uso industrial (XAVIER, *et al.*, 2005).

Além de conseqüências ecológicas, a eutrofização também provoca conseqüências sanitárias por interferir na qualidade da água. Dentre elas podemos destacar a obstrução de filtros em ETAs, aumento dos custos com produtos químicos para o tratamento da água, sabor e odor desagradáveis nas águas de abastecimento e variação freqüente de pH. No entanto, o principal problema sanitário e que acarreta dificuldades no tratamento é a toxicidade de certas espécies de cianobactérias capazes de liberar compostos potencialmente tóxicos na água (BRANCO, 1986; DI BERNARDO, 1995; CARNEIRO *et al.*, 2005).

1.7 Fitoplâncton em ambientes de água doce

1.7.1 Condições ambientais para o seu desenvolvimento

Em todos os corpos d'água, diminutas células fotossintetizantes e pequenos animais ocorrem suspensos na massa d'água como *plâncton* (do grego “errante”). As algas planctônicas e as cianobactérias, juntas constituem o *fitoplâncton*, são o início da cadeia alimentar para os organismos heterotróficos que vivem nos corpos d'água (RAVEN *et al.*, 1996) juntamente

com o bacterioplâncton (COTNER; BIDDANDA, 2002; WEISSE, 2006) e as macrófitas. O fitoplâncton, constituinte fotossintetizante do plâncton, é geralmente composto por organismos unicelulares. Alguns destes são muito simples na aparência, enquanto outros têm formas intrincadas e delicadamente detalhadas que às vezes estão reunidas em colônias ou filamentos.

Os ambientes aquáticos possuem comunidades fitoplanctônicas com variedade, abundância e distribuição próprias que dependem de características abióticas (temperatura, luz, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, estratificação térmica e regime de mistura) e bióticas (herbívoros, parasitas, competição). Em geral, quando é extraída e analisada uma amostra do fitoplâncton de um corpo hídrico, principalmente mananciais com circulação relativamente fechada, como lagos e represas, é comum a presença de cianobactérias, clorofíceas e diatomáceas, embora as espécies presentes possam variar de um ambiente a outro. Além disso, cada ambiente apresenta variações sazonais na composição do fitoplâncton, que definem o ciclo anual. Também deve ser considerada a influência da ação humana, que acarreta mudanças significativas na comunidade fitoplanctônica (DI BERNARDO, 1995).

Nos ambientes de água doce é comum a coexistência de um grande número de espécies de algas fitoplanctônicas. Geralmente, duas ou mais espécies tornam-se dominantes no ambiente, enquanto conjuntamente pode ser encontrado um grande número de espécies raras e subdominantes. A diversidade de espécies das comunidades fitoplanctônicas é superior ao estimado por cálculos teóricos e matemáticos. Isto porque as condições do ambiente tendem a mudar constantemente, não proporcionando uma uniformidade por períodos de tempo suficientemente longos, implicando em um processo lento de exclusão competitiva. Também existem relações alelopáticas entre as espécies, ou seja, a liberação no ambiente de compostos

produzidos por uma espécie que podem ser utilizados por outra, além de necessidades diferentes de nutrientes, geram um equilíbrio misto de populações. Sendo o ambiente e os organismos dinâmicos, existem diversos fatores que influenciam o desenvolvimento do fitoplâncton. Os fatores ambientais mais importantes que regulam o seu desenvolvimento são intensidade luminosa, temperatura da água, distribuição vertical dos organismos na coluna d'água e disponibilidades de nutrientes no meio aquático (WETZEL, 1993).

A intensidade luminosa influencia o desenvolvimento do fitoplâncton em função da fotossíntese ocorrer somente nas camadas superficiais líquidas que recebem luz. Em lagos profundos, observa-se a existência de uma região superior, onde há luz suficiente para que a produção de oxigênio pela fotossíntese seja maior do que a demanda de oxigênio para a respiração. Há também uma região inferior, onde a luz é escassa ou ausente, na qual a demanda de oxigênio para a respiração é maior do que a concentração de oxigênio produzida pela fotossíntese. A intensidade luminosa que atinge a superfície de um lago diminui exponencialmente com a profundidade. Compostos orgânicos dissolvidos, moléculas de água e partículas suspensas, absorvem e dispersam a luz, influenciando na distribuição vertical dos organismos. Além do uso da energia solar por organismos fotossintéticos, esta é dissipada na forma de calor e define a estrutura térmica dos ambientes aquáticos (INFANTE, 1988; WETZEL, 1993; DI BERNARDO, 1995).

A porção iluminada da coluna d'água pode variar de alguns centímetros até metros e é denominada *zona eufótica*. Sua extensão depende da capacidade do meio em atenuar a radiação subaquática. O limite inferior da *zona eufótica* é assumido como a profundidade onde a radiação corresponde a 1% da que atinge a superfície. Esta profundidade da coluna d'água também é chamada de *ponto de compensação*, uma vez que nessa região a produção

de oxigênio pela fotossíntese é aproximadamente igual ao consumo de oxigênio pela respiração das comunidades (ESTEVES, 1998).

Devido ao elevado calor específico da água, as flutuações de temperatura observadas na água são menos acentuadas do que no ar. Parte da energia solar que penetra na água fica retida na forma de calor e, pela ação mecânica de ventos, o calor se distribui em diferentes profundidades. Quando o ar está quente, o calor é acumulado principalmente na superfície da água. A água superficial torna-se mais quente e com menor massa específica podendo ocorrer à estratificação térmica do ambiente aquático durante a primavera e verão, em regiões temperadas, ou épocas de calmaria, em regiões tropicais. A temperatura também pode interferir na distribuição de nutrientes na *zona eufótica* pela formação de camadas com diferentes densidades. Nesses períodos, a camada superficial do ambiente aquático é chamada *epilimnio* e a camada profunda, *hipolimnio*. A região intermediária, chamada de *metalimnio*, tem importância para o fitoplâncton, pois quando os organismos estão sedimentando na coluna d'água e alcançam essa região, nela permanecem. Quando a temperatura da água da superfície é resfriada suficientemente para provocar a mistura das camadas e desfazer a estratificação, o plâncton localizado no *metalimnio* se distribui uniformemente ao longo da coluna d'água, desde a superfície até maiores profundidades (INFANTE, 1988; DI BERNARDO, 1995; ESTEVES, 1998).

As algas são tolerantes a variações de temperatura do ambiente. A temperatura mínima em que ocorre a fotossíntese depende de cada espécie. Para muitas diatomáceas, situa-se próximo a 5°C, para outras, cerca de 15°C. As cianobactérias como grupo apresentam em geral uma tolerância muito maior a temperaturas elevadas do que as outras algas. As algas termofílicas,

com desenvolvimento ótimo a temperaturas superiores a 45°C, são quase exclusivamente cianobactérias (WETZEL, 1993)

Para sua sobrevivência, as algas fitoplanctônicas devem permanecer na *zona eufótica*, pois é a região que apresenta luminosidade suficiente para a realização da fotossíntese. No entanto, a tendência física da maioria dos organismos do plâncton é saírem dessa região, pois como não possuem mobilidade própria e sua densidade é de 1,01 a 1,03 vezes maior do que a da água, afundam em águas não turbulentas. Assim, o fitoplâncton apresenta vários mecanismos para superar a desvantagem de sua alta densidade. A formação de mucilagem, cuja densidade é menor ou próxima a da água, é uma das adaptações em muitas espécies de clorofíceas e cianobactérias. A densidade das células também pode diminuir com a formação e armazenamento de gotículas de óleo, freqüentes em diatomáceas e fitoflagelados. O aumento da superfície de contato e da relação superfície/volume também aumenta sua flutuabilidade. O aumento da superfície é alcançado pela formação de prolongamentos nas células, como espinhos, setas, processos celulares, e também pela formação de colônias de organismos unicelulares. As cianobactérias ainda possuem a capacidade de formação de vacúolos de gás intracelulares (aerótopos) que, além de auxiliarem na flutuação, também permitem que os organismos se movimentem ao longo da coluna d'água (INFANTE, 1988; WETZEL, 1993; DI BERNARDO, 1995; ESTEVES, 1998; HAIDER *et al.*, 2003).

Os nutrientes mais importantes para o desenvolvimento do fitoplâncton são fósforo, nitrogênio e sílica, sendo o primeiro considerado limitante na maioria dos sistemas. A sílica é importante para as diatomáceas, pois constitui a parede celular dessas algas. A distribuição dos nutrientes na coluna d'água é controlada por diferentes fatores, sendo a estratificação térmica o mais importante. Em lagos profundos, durante o período de estratificação, o

hipolimnio, de onde se origina a maior parte dos nutrientes para a *zona eufótica*, permanece isolado. Nestas condições, ocorre um esgotamento dos principais nutrientes na *zona eufótica*. Organismos como as cianobactérias são capazes de absorver nutrientes ativamente, mesmo quando a concentração intracelular é maior do que a extracelular. Este fenômeno ocorre quando há concentrações significativas de nutrientes no ambiente, antes da estratificação. Assim, as populações podem crescer e se reproduzir após o esgotamento de nutrientes na *zona eufótica* (ESTEVES, 1998).

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes no metabolismo dos ecossistemas aquáticos. Esta importância deve-se principalmente à sua participação na formação de proteínas, um dos componentes básicos da biomassa. Dentre as diferentes formas de nitrogênio, o nitrato, juntamente com o íon amônio, representam as principais fontes de nitrogênio para as algas. Quando presentes em baixas concentrações podem atuar como fator limitante na produção primária de ecossistemas aquáticos. As principais fontes naturais de nitrogênio podem ser a chuva, material orgânico e inorgânico de origem alóctone (provenientes da drenagem superficial e subterrânea) e a fixação de nitrogênio molecular dentro do próprio ambiente aquático (realizada pelo grupo das cianobactérias) (WETZEL, 1993; ESTEVES, 1998).

O fósforo desempenha papel principal no metabolismo biológico relativamente à pequena quantidade que está disponível na hidrosfera. Quando comparado com a abundância natural de outros nutrientes importantes, o fósforo é o menos abundante de todos, sendo, portanto, o que mais vezes limita a produtividade biológica. Nos sistemas aquáticos, a mais significativa forma de fósforo inorgânico é o fosfato, pois é a principal forma assimilada pelas algas fitoplanctônicas (WETZEL, 1993). Este elemento participa de processos fundamentais do

metabolismo dos organismos, como armazenamento de energia (forma uma fração essencial da molécula de ATP) e estruturação da membrana celular (através dos fosfolípidios). O fósforo tem origem de fontes naturais e artificiais. As rochas das bacias de drenagem são as principais fontes naturais de fósforo, sendo a quantidade de fósforo disponibilizada proporcional ao conteúdo presente nos minerais formadores das rochas e disponibilizado através do intemperismo. Outros fatores naturais que contribuem com aporte de fósforo são material particulado presente na atmosfera e decomposição de organismos de origem alóctone. Como fontes artificiais de fósforo destacam-se esgotos domésticos e industriais, material particulado de origem industrial presente na atmosfera, produtos de limpeza e fertilizantes agrícolas (ESTEVEES, 1998).

Os fosfatos e os nitratos são rapidamente consumidos, na parte superior dos lagos, durante os períodos de florescimentos intensos do fitoplâncton, enquanto, no fundo, há maior concentração desses ânions, devido à decomposição da matéria orgânica e sua liberação a partir dos sedimentos, especialmente em condições anóxicas (INFANTE, 1988; DI BERNARDO, 1995).

1.7.2 Classificação sanitária

A identificação dos organismos fitoplanctônicos em categorias taxonômicas específicas é essencial para o conhecimento da estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos. Entretanto, para a engenharia sanitária é fundamental o conhecimento dos gêneros e de algumas espécies de algas dominantes, pois podem afetar a qualidade da água. Algumas produzem odor e sabor, outras influenciam significativamente nos processos de tratamento da

água, como coagulação química, decantação e filtração; além daquelas tóxicas ao homem ou produtoras de subprodutos metabólicos que, na presença de cloro, formam compostos cancerígenos (DI BERNARDO, 1995). Nesse sentido, a classificação utilizada não pode ser considerada como uma classificação taxonômica e, muito menos filogenética, mas sim um sistema para uso diário e exclusivo para a abordagem sanitária (BRANCO, 1986). Segundo Palmer (1962), por conveniência, a maior parte das algas fitoplanctônicas de importância para águas de abastecimento é classificada em quatro grupos gerais: cianobactérias (cianofíceas ou algas azuis), clorofíceas (algas verdes), diatomáceas e fitoflagelados (flagelados pigmentados).

O estudo e a classificação dos organismos que tem influência na engenharia sanitária constituem o campo de ação da *Hidrobiologia Sanitária*. A Hidrobiologia Sanitária se ocupa dos organismos diretamente prejudiciais à saúde humana e com todos os seres vivos aquáticos capazes de fornecer informações sobre as características e condições reinantes no meio aquático, que possam interessar à saúde pública. Na prática, utiliza a microscopia para o estudo sistemático das algas e organismos que constituem o fitoplâncton de ambientes continentais de água doce (BRANCO, 1986). Assim, os principais grupos de organismos fitoplanctônicos, classificados de acordo com a engenharia sanitária, estão descritos a seguir.

A denominação *Algas*, muitas vezes utilizada como sinônimo de fitoplâncton, não representa um grupo taxonômico formal de organismos, mas um amplo número de divisões com representantes que tem características previamente conhecidas. Essas divisões distinguem-se umas das outras de acordo com uma combinação de características, entre elas, pigmentos fotossintetizantes, substância de reserva e revestimento e organização celular (WEHR; SHEATH, 2003).

1.7.2.1 Cianobactérias

O grupo das cianobactérias compreende os organismos da divisão Cyanophyta, classe Cyanophyceae (BICUDO; MENEZES, 2006). As cianobactérias (também chamadas algas azuis ou cianofíceas) são procariotas e fotossintetizantes (ROUND, 1983; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995). Procariotas, por não possuírem membranas celulares internas, delimitando núcleo e cloroplastos. Fotossintetizantes, por possuírem aparato fotossintético em lamelas citoplasmáticas, sendo capazes de realizar a fotossíntese e contribuírem para a produção primária dos ambientes aquáticos (MUR; SKULBERG; UTKILEN, 1999).

Constituem um grupo diversificado, ocorrendo formas unicelulares isoladas ou formando colônias e filamentos (ROUND, 1983; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995). As formas unicelulares podem se dividir, assexuadamente, em um, dois ou três planos. As formas filamentosas podem formar ramificações falsas ou verdadeiras. A manutenção das colônias ocorre pela presença de polissacarídeos, formando uma mucilagem ao redor das células (WHITTON; POTTS, 2000).

A coloração das células é verde-azulada devido aos pigmentos ficobilinas (aloficocianina, ficocianina e ficoeritrina), mas também possuem clorofila *a* e carotenóides. A substância de reserva das cianobactérias é cianoficina (semelhante ao glicogênio) (ROUND, 1983; INFANTE, 1988; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003).

As formas unicelulares reproduzem-se assexuadamente por fissão binária. Já as formas filamentosas apresentam duas formas de reprodução. Pode ocorrer a fragmentação dos filamentos, com formação de hormogônios que darão origem a novos filamentos; ou pela

diferenciação de células vegetativas em esporos e acinetos. Essas células têm maior volume, membrana celular espessada e acumulam substâncias de reserva, uma vez que são capazes de sobreviver a condições desfavoráveis (ROUND, 1983; RAVEN *et al.*, 1996; WHITTON; POTTS, 2000). As organizações filamentosas podem apresentar movimentos deslizantes ou oscilatórios, associados à produção de mucilagem (ROUND, 1983), bem como ao movimento de microfibrilas protéicas externas (REVIERS, 2006). Vacúolos de gás, isto é, estruturas utilizadas para flutuabilidade, são encontrados em muitos gêneros do grupo (WHITTON; POTTS, 2000).

Além disso, alguns gêneros de cianobactérias possuem a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico através das células vegetativas e também dos heterocitos. Os heterocitos são células vegetativas diferenciadas, com membrana espessada e conteúdo homogêneo. Concentram a enzima nitrogenase que realiza a fixação do nitrogênio. Essa capacidade permite que esses gêneros sejam importantes na fertilização das águas e também dos solos (ROUND, 1983; RAVEN *et al.*, 1996; ESTEVES, 1998). A presença ou ausência dessas células diferenciadas é uma importante característica para reconhecimento dos gêneros.

As cianobactérias apresentam grande importância ecológica, particularmente nos ciclos globais do carbono e do nitrogênio, e também pelo seu significado sanitário. Elas podem causar prejuízos nos ambientes onde ocorrem, principalmente, águas ricas em nutrientes, altas temperaturas e maior disponibilidade de luz, porque são organismos potencialmente tóxicos. Capazes de produzir cianotoxinas com ação hepatotóxica ou neurotóxica, podem levar a morte animais e humanos que ingerirem alimento ou água contaminados. Toxinas irritantes ao contato também são produzidas pelas cianobactérias (SIVONEN; JONES, 1999; FUNASA, 2003).

Alguns gêneros de cianobactérias também podem produzir odor de terra ou mofo na água, como *Anabaena* (Figura 1.1A) e *Microcystis* (Figura 1.1B). Estes mesmos gêneros, bem como *Planktothrix* (Figura 1.1C), podem obstruir filtros (PALMER, 1962; BRANCO, 1986; DI BERNARDO, 1995).

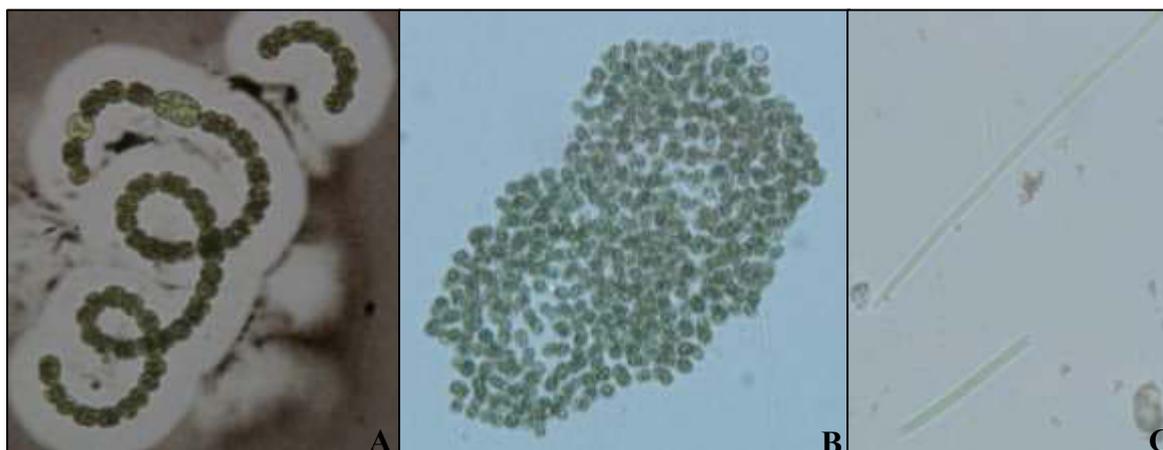


Figura 1.1. Gêneros de Cianobactérias. A. *Anabaena*. B. *Microcystis*. C. *Planktothrix*.
Fonte: Fotos do Autor.

1.7.2.2 Clorofíceas

O grupo das clorofíceas compreende as algas verdes classificadas na Divisão Chlorophyta (BICUDO; MENEZES, 2006). Correspondem a um grupo amplo e variado de algas unicelulares, cerca de 570 gêneros (REVIERS, 2006), com maior diversidade de espécies, formas e tamanhos, que podem formar colônias, filamentos e apresentar mobilidade devido à presença de flagelos. As formas coloniais geralmente estão envolvidas por mucilagem (ROUND, 1983; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; RAVEN *et al.*, 1996; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006). Na abordagem da Engenharia Sanitária, as algas verdes flageladas estão incluídas no grupo dos fitoflagelados (PALMER, 1962; BICUDO; MENEZES, 2006).

As células apresentam coloração verde intensa, devido à predominância dos pigmentos clorofila *a* e clorofila *b* (contidos em cloroplastos de formas variadas). Também possuem carotenos e xantofilas. A substância de reserva é o amido. A maioria dos organismos possui uma parede celulósica interna e uma parede externa de pectina (INFANTE, 1988).

A reprodução é assexuada por divisão binária ou fragmentação das colônias e filamentos. A reprodução sexuada ocorre, em algumas espécies, com a formação de gametas móveis ou imóveis.

As clorofíceas podem ocorrer em qualquer época do ano, mas desenvolvem-se rapidamente no verão com aumento da temperatura, preferencialmente em águas neutras a alcalinas. Alguns gêneros são típicos de ambientes oligotróficos e águas ácidas, mas não impede que ocorram em águas alcalinas e eutróficas (DI BERNARDO, 1995). As formas cocóides unicelulares e coloniais são comuns em águas lânticas e rios de baixa velocidade, quando nutrientes, luz e temperatura são razoavelmente altos. Já as filamentosas podem ocorrer aderidas ao substrato, geralmente em águas estagnadas (WEHR; SHEATH, 2003).

Alguns gêneros de clorofíceas podem prejudicar a qualidade das águas em que ocorrem produzindo odor de pescado ou herbáceo na água, como *Staurastrum* (Figura 1.2A) e *Dictyosphaerium* (Figura 1.2B). Outros podem obstruir filtros, como *Spirogyra* (Figura 1.2C) e *Closterium* (Figura 1.2D) (PALMER, 1962; BRANCO, 1986).

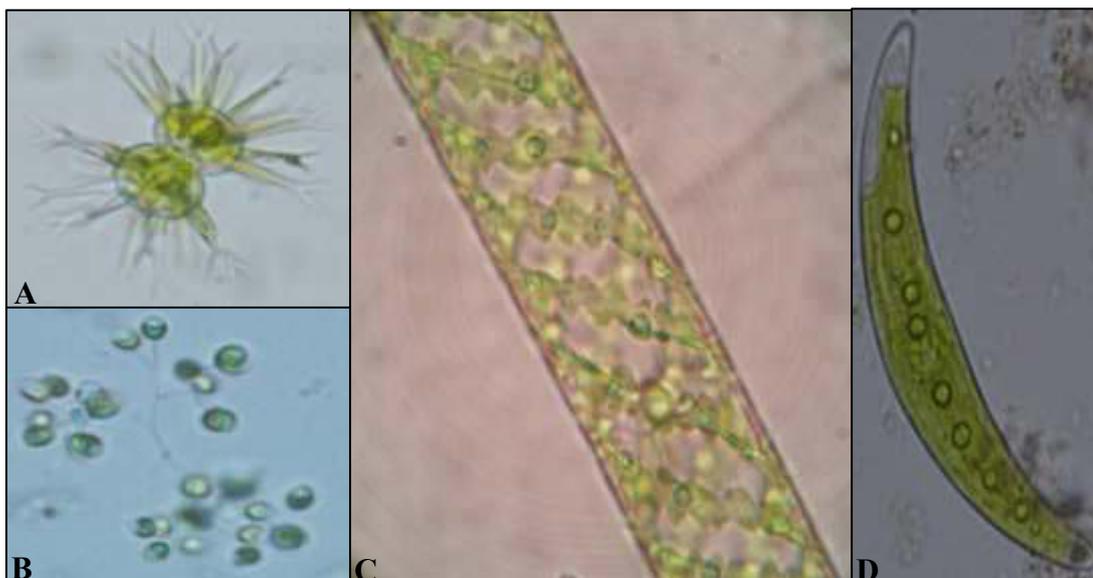


Figura 1.2. Gêneros de Clorofíceas. A. *Staurastrum*. B. *Dictyosphaerium*. C. *Spirogyra*. D. *Closterium*. Fonte: Fotos do Autor.

1.7.2.3 Diatomáceas

O grupo das diatomáceas compreende as algas classificadas na divisão Chrysophyta, classe Bacillariophyceae (BICUDO; MENEZES, 2006). As diatomáceas são algas unicelulares, que podem formar filamentos ou coloniais, e são componentes importantes do fitoplâncton (ROUND, 1983; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006). Possuem parede celular peculiar, dividida em duas metades (valvas) encaixadas (epivalva e hipovalva). Esta parede celular dupla, também chamada de frústula, é composta de sílica. Apresentam formas variadas, podendo ser divididas entre organismos com simetria radial (cêntricas) e organismos com simetria bilateral (penadas) (ROUND, 1983; DI BERNARDO, 1995; RAVEN *et al.*, 1996; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006).

As características mais evidentes do protoplasto das diatomáceas são os plastídios acastanhados com clorofila *a* e *c*, carotenóide e fucoxantina. A substância de reserva é baseada em crisolaminarina e lipídios (ROUND, 1983; INFANTE, 1988; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006).

As diatomáceas podem apresentar movimento de deslizamento associado à produção e secreção de mucilagem; outras podem ocorrer aderidas a um substrato através de pedúnculo (ROUND, 1983; REVIERS, 2006).

As diatomáceas reproduzem-se assexuadamente por divisão binária. Cada célula-filha recebe uma parte da frústula, sendo secretada uma nova hipovalva. Espécies com frústulas muito rígidas podem causar diminuição no tamanho da população. A diminuição do tamanho tem um limite, quando, então, ocorre reprodução sexuada. Na reprodução sexuada, há união dos gametas, formando uma estrutura chamada auxósporo que origina novamente células vegetativas, restabelecendo o tamanho da população (REVIERS, 2006).

As diatomáceas ocorrem, preferencialmente, aderidas à vegetação aquática ou aos substratos bentônicos. No plâncton, são abundantes em ambientes com águas turbulentas, baixas temperaturas e com altas concentrações de sílica (DI BERNARDO, 1995; REVIERS, 2006).

Alguns gêneros de diatomáceas podem produzir odor na água. O gênero *Asterionella* (Figura 1.3A) é considerado o mais danoso, produzindo odor aromático, semelhante ao gerânio. Outros podem obstruir filtros, como *Cyclotella* (Figura 1.3B), *Ulnaria* (Figura 1.3C) e *Fragilaria* (Figura 1.3D) (PALMER, 1962; BRANCO, 1986).



Figura 1.3. Gêneros de Diatomáceas. A. *Asterionella*. B. *Cyclotella*. C. *Ulnaria*. D. *Fragilaria*. Fonte: Fotos do Autor.

1.7.2.4 Fitoflagelados

Os fitoflagelados formam um grupo heterogêneo, semelhantes apenas por apresentarem flagelos como meio de locomoção. Não é uma divisão taxonômica verdadeira, pois organismos pertencentes a distintas categorias taxonômicas estão aqui reunidos. Encontram-se neste grupo flagelados das divisões Chrysophyta, classe Chrysophyceae; Cryptophyta, classe Cryptophyceae; Pyrrophyta, classe Dinophyceae; Euglenophyta, classe Euglenophyceae; Chlorophyta, classe Chlorophyceae (BICUDO; MENEZES, 2006).

As crisofíceas (Divisão Chrysophyta, classe Chrysophyceae) possuem, geralmente, dois flagelos desiguais, são unicelulares e podem formar colônias. A célula pode apresentar-se revestida por escamas silicosas, cápsula ou serem desprovidas de parede celular rígida. Os pigmentos presentes são clorofilas *a* e *c*, β -caroteno e algumas xantofilas. A substância de reserva não é amido, mas lipídeos e crisolaminarina. A reprodução é assexuada, por divisão

longitudinal (ROUND, 1983; INFANTE, 1988; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006).

As criptofíceas (Divisão Cryptophyta, classe Cryptophyceae) são unicelulares isoladas, possuem dois flagelos desiguais e pigmentos clorofila *a* e *c*, carotenos, xantofilas, ficocianina e ficoeritrina. Em função dessa composição de pigmentos, sua coloração é variada, ocorrendo algas pardas, azuis, verde-azuladas, vermelhas ou verde oliva. O amido, associado a pirenóides, é a substância de reserva. Reproduzem-se por divisão longitudinal (ROUND, 1983; INFANTE, 1988; DI BERNARDO, 1995; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006).

Os dinoflagelados (Divisão Pyrrophyta, classe Dinophyceae) são organismos unicelulares biflagelados, com pigmentos clorofila *a* e *c*, xantofilas e carotenos, providos ou desprovidos de placas celulósicas rígidas formando uma parede (teca) ao redor da célula. A reprodução é assexuada por fissão binária. Apresentam amido e óleos como substâncias de reserva (ROUND, 1983; DI BERNARDO, 1995; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006).

As euglenofitas (Divisão Euglenophyta, classe Euglenophyceae) apresentam organização celular complexa, células desnudas ou com teca externa rígida impregnada de sais minerais (lórica) com dois flagelos desiguais. A forma da célula muda constantemente durante a locomoção. Possuem estigma, cloroplastos discóides, estrelados ou em bandas com pigmentos clorofila *a* e *b*, β -carotenos e xantofilas. Paramido e lipídios são as substâncias de reserva. A reprodução é assexuada por divisão longitudinal (ROUND, 1983; INFANTE, 1988; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006).

As clorofíceas, já descritas anteriormente, podem ser unicelulares ou coloniais, nuas ou providas de uma teca. Possuem flagelos iguais, geralmente, em número de dois a quatro (ROUND, 1983; VAN DER HOEK; MANN; JAHNS, 1995; WEHR; SHEATH, 2003; REVIERS, 2006).

Devido à heterogeneidade dos organismos agrupados em fitoflagelados, a ocorrência dos indivíduos se dá em uma ampla variedade de ambientes. Os dinoflagelados ocorrem em águas superficiais relativamente quentes, luz abundante, ricas em matéria orgânica e nutrientes, com pH neutro a alcalino. As crisofíceas relacionam-se com águas pobres em nutrientes, baixas alcalinidade e condutividade e pH neutro a levemente ácido. As criptofíceas ocorrem em ambientes ricos em matéria orgânica e nutrientes. Já as euglenofíceas podem ocorrer em ambientes ricos em matéria orgânica, amônia e substâncias húmicas, além de dominarem em ambientes ácidos. As clorofíceas estão associadas às águas ricas em nutrientes (INFANTE, 1988; DI BERNARDO, 1995; RAVEN *et al.*, 1996; WEHR; SHEATH, 2003).

Alguns gêneros de fitoflagelados podem produzir odor na água. O gênero *Synura* (Figura 1.4A) é considerado o mais danoso, produzindo odor de pepino ou pescado. *Eudorina* (Figura 1.4B), *Peridinium* e *Chlamydomonas* (Figura 1.4C) também podem produzir odor de pescado. Outros gêneros, como *Trachelomonas* (Figura 1.4D) e *Dinobryon* (Figura 1.4E), podem obstruir filtros (PALMER, 1962; BRANCO, 1986).

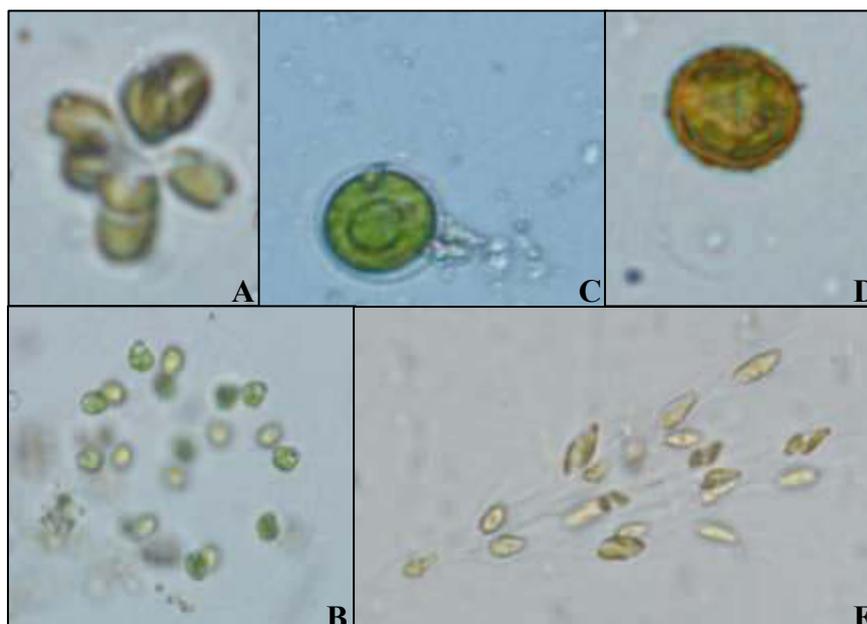


Figura 1.4. Gêneros de Fitoflagelados. A. *Synura*. B. *Eudorina*. C. *Chlamydomonas*. D. *Trachelomonas*. E. *Dinobryon*. Fonte: Fotos do Autor.

1.7.3 Problemas para o abastecimento público

1.7.3.1 Cianobactérias: florações e cianotoxinas

No ambiente aquático eutrofizado, o desenvolvimento das cianobactérias é favorecido, apresentando melhor crescimento em águas com pH entre 6 e 9, temperatura de 15°C a 30°C e alta concentração de nutrientes (destacando-se fósforo e nitrogênio) (CEBALLOS; AZEVEDO; BENDATE, 2006).

A preocupação com as florações de cianobactérias está na capacidade para produzir toxinas, denominadas cianotoxinas, apresentada por alguns gêneros, além de sabor e odor que podem causar na água tratada. As toxinas podem ter efeito crônico ou agudo, acarretando,

principalmente, danos hepáticos e neurológicos aos indivíduos intoxicados. Algumas espécies de cianobactérias que merecem destaque pela potencial produção de toxinas pertencem aos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis* e *Planktothrix*.

As toxinas podem ser classificadas, de acordo com seu efeito tóxico, em neurotoxinas, hepatotoxinas e dermatotoxinas. As neurotoxinas, principalmente as saxitoxinas, são um grande grupo de compostos nitrogenados heterocíclicos com estrutura química diversificada e com diferentes efeitos tóxicos em mamíferos. Entretanto, o efeito final dessas toxinas é o mesmo, ou seja, a paralisação da atividade muscular, causando a morte por parada respiratória após poucos minutos ou poucas horas de exposição (SIVONEN; JONES, 1999; CEBALLOS; AZEVEDO; BENDATE, 2006). As hepatotoxinas, sendo a microcistina a mais conhecida, são peptídeos cíclicos ou alcalóides com ação tóxica lenta nas células hepáticas, podendo causar a morte num intervalo de poucas horas a poucos dias. Já as dermatotoxinas compreendem dois grupos de toxinas, os lipopolissacarídeos e os alcalóides dermatotóxicos, causadores de reações alérgicas na pele humana ao contato com as células das cianobactérias (SIVONEN; JONES, 1999; FUNASA, 2003).

1.7.3.2 O caso de Caruaru

O primeiro caso documentado de morte humana por intoxicação de cianotoxinas ocorreu em 1996, na cidade de Caruaru, Estado de Pernambuco. Diversos pacientes de uma clínica de hemodiálise faleceram por intoxicação intravenosa pelo uso de água de diálise contaminada por microcistina.

Na época do ocorrido, de acordo com o estudo realizado por Jochimsen *et al.* (1998), a cidade de Caruaru era abastecida com água do reservatório Tabocas, localizado a 40 km da cidade. Através de tubulações, a água bruta era conduzida do reservatório até a ETA municipal onde recebia tratamento. O tratamento consistia na floculação com sulfato de alumínio, decantação por um período de duas a três horas, filtração em filtros de areia e, por fim, cloração. No entanto, a clínica de hemodiálise estava fora desse sistema.

A clínica era abastecida duas vezes por dia por um caminhão-pipa com água que vinha da ETA, porém, sem passar pelas etapas de filtração e cloração. Ocasionalmente, os operadores da ETA forneciam cloro ao motorista do caminhão-pipa para que ele fizesse a cloração no caminhão. Porém, não havia registros de que isso era feito. Após receber a água, a clínica realizava seu próprio tratamento. Esse tratamento consistia em filtração com filtro de areia, tanque para adsorção em carvão ativado, deionizador e filtro microporoso antes do uso nas sessões de hemodiálise. Segundo os funcionários da clínica, a cada seis meses o tanque de carvão era trocado e a cada três meses era feita a troca da areia e do filtro microporoso. Entretanto, essas trocas não foram realizadas três meses antes do ocorrido, embora a água distribuída pelo caminhão-pipa apresentasse visível turbidez.

Após as sessões de diálise, de quatro horas cada três vezes por semana, no período em que houve a contaminação da água, os pacientes relatavam distúrbios visuais, náusea e vômitos. Dos 124 pacientes da clínica na época, 101 foram avaliados por Jochimsen *et al.* (1998) e destes, 50 morreram num período de até sete meses após o tratamento. Esses pacientes eram expostos a 120 – 150 litros de água por sessão de hemodiálise.

Os resultados das análises de microcistina mostraram a presença dessa toxina na água bruta do reservatório Tabocas, na água transportada pelo caminhão-pipa, na água após o tratamento realizado na clínica e nas amostras de tecido hepático dos pacientes, antes e depois do tratamento (JOCHIMSEN *et al.*, 1998; AZEVEDO, *et al.*, 2002).

De acordo com Azevedo *et al.* (2002), foi estimada que a água usada pela clínica de hemodiálise apresentava uma concentração de $19,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina. Este valor é, aproximadamente, 20 vezes maior que a concentração de $1 \mu\text{g.L}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, isto é, o limite estabelecido pela OMS (1998) como nível seguro para consumo oral de microcistina na água de abastecimento.

1.7.3.3 Dificuldades no tratamento de água

A presença de algas e cianobactérias na água bruta aduzida às ETAs pode causar problemas operacionais em várias etapas de tratamento, tais como dificuldade de coagulação e floculação, baixa eficiência do processo de sedimentação, colmatação dos filtros e aumento da necessidade de produtos para a desinfecção. Como consequência desses problemas operacionais, verifica-se, geralmente, a redução na eficiência dos processos de tratamento e o surgimento de problemas na água tratada associados à presença de algas, cianobactérias e seus subprodutos extracelulares (DI BERNARDO, 1995; CODD, 2000; FUNASA, 2003).

Algumas algas e seus subprodutos podem produzir odores desagradáveis e gerar sabores indesejáveis na água, além da potencial produção de toxinas, tornando necessário, em algumas situações, introduzir carvão ativado na seqüência de tratamento para remoção desses

subprodutos e encarecendo o custo do tratamento da água. Vários gêneros de cianobactérias são capazes de produzir odor de capim, barro ou mofo, como *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium* e *Microcystis*, além de serem potenciais produtoras de toxinas. Assim, sabor e odor da água podem ser usados como sinal de alerta para a ocorrência de cianobactérias. Contudo, é importante destacar que a ausência de odor e sabor não implica na ausência de cianobactérias e, conseqüentemente, de cianotoxinas (FALCONER *et al.*, 1999).

Benetti, De Lucca e Cybis (2009) realizaram experimentos, piloto e em escala de bancada, para verificar a eficiência de remoção de 2-metilisoborneol e geosmina, substâncias causadoras de gosto e odor na água. As tecnologias testadas foram aeração (aerador tipo cascata e torre de dessorção gasosa), filtração em membranas de nanofiltração, oxidação química e biológica e adsorção em carvão ativado. Os resultados de nanofiltração mostraram excelentes percentuais de remoção, superiores a 95%. Adsorção em carvão ativado removeu concentrações desses compostos de 1.200 ng.L^{-1} para abaixo do limiar de detecção (10 ng.L^{-1}). A oxidação biológica, através de bactérias, mostrou-se uma alternativa promissora, com 80% de eficiência de remoção, mas necessita de mais pesquisas para conclusões precisas. As outras tecnologias estudadas apresentaram resultados insatisfatórios.

A presença de materiais orgânicos na rede de distribuição de água, entre os quais o material orgânico intra e extracelular dos organismos fitoplanctônicos, pode servir como subproduto para o desenvolvimento de bactérias que têm a capacidade de atacar alguns tipos de materiais constituintes dos tanques de reservação e das tubulações de distribuição de água e, também, contribui para a deterioração da qualidade bacteriológica da água. Além disso, a matéria orgânica proveniente das algas, quando submetida à cloração, pode levar a formação de

subprodutos clorados, dentre eles os trihalometanos (THM), que são potencialmente cancerígenos (DI BERNARDO, 1995; FUNASA, 2003).

As cianotoxinas, que se encontram armazenadas dentro das células da cianobactéria produtora, são liberadas para o meio aquático quando ocorre lise celular (SIVONEN; JONES, 1999). As toxinas dissolvidas na água representam o mais sério problema para as ETAs, pois sua remoção exige o uso de alternativas avançadas de tratamento, como oxidação e adsorção (DI BERNARDO, 1995; FUNASA, 2003).

Estudos realizados por Müller (2008) e Müller, Raya-Rodriguez e Cybis (2009) avaliaram a remoção da cianotoxina microcistina por carvão ativado em pó. O uso de carvão associado ao tratamento convencional mostrou-se eficiente, com remoção dessa cianotoxina dissolvida na água superior a 90%.

Diversos autores (LAMBERT; HOLMES; HRUDEY, 1996; CHOW *et al.*, 1999; FUNASA, 2003; BRASIL, 2004b; HOEGER *et al.*, 2004; KURODA *et al.*, 2005; entre outros) mostraram, em seus trabalhos, que o processo de tratamento convencional da água não é eficiente na remoção das cianotoxinas dissolvidas na água. O tratamento convencional mostra-se eficiente na remoção de toxina intracelular, ou seja, na remoção de células viáveis de cianobactérias produtoras de toxina, bem como células de outras cianobactérias e algas (CHOW *et al.*, 1999).

Na tentativa de evitar esses problemas causados pelas algas e cianobactérias, uma alternativa pode ser a aplicação de algicidas para o controle do crescimento das populações fitoplanctônicas (DI BERNARDO, 1995; FUNASA, 2003, BRASIL, 2004a). A Portaria nº

518/04 (BRASIL, 2004a), permite a aplicação de sulfato de cobre diretamente no manancial, desde que o número de células de cianobactérias não ultrapasse 20.000 céls./mL.

Essa prática deve ser cuidadosamente avaliada, pois a morte das cianobactérias ocasiona a liberação das cianotoxinas para o ambiente. A presença de toxinas dissolvidas é uma das maiores dificuldades para os processos de tratamento, conforme mencionado anteriormente. Além disso, o cobre é tóxico aos demais organismos vivos, podendo provocar desequilíbrio ambiental (DI BERNARDO, 1995).

Uma alternativa para evitar captar água com alta densidade algal é a escolha do local da captação no manancial e da profundidade da tomada d'água. Isso porque a distribuição horizontal e vertical das populações de algumas algas e cianobactérias pode variar, significativamente, no corpo d'água, seja ele lago, reservatório ou rio (FUNASA, 2003). A contaminação da água que alimenta a ETA pode ser consideravelmente reduzida alocando-se o ponto de captação longe de zonas protegidas e de baixa circulação (baías e reentrâncias) onde a espuma formada pelas algas tende a se acumular. A seleção apropriada da profundidade da tomada d'água, por sua vez, pode evitar a captação de água no ponto de máxima densidade de células de cianobactérias, uma vez que a tendência desses organismos é manter-se nas camadas superiores da coluna d'água, em função da temperatura e da intensidade luminosa.

1.8 Legislação brasileira

Após o caso de Caruaru, houve uma revisão na portaria brasileira de potabilidade, na época, Portaria nº 36 do Ministério da Saúde, de 1990 (BRASIL, 1990). Como a hepatotoxina microcistina apresenta ampla ocorrência mundial, existem muitos estudos sobre sua estrutura, mecanismo de ação, efeitos nos organismos, toxicidade, entre outros. Os resultados levaram à recomendação de uma concentração máxima de microcistina na água tratada, pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1998), de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$. Assim, esta concentração foi adotada pela legislação brasileira, criando-se uma nova Portaria de Potabilidade, a Portaria nº 1469 do Ministério da Saúde, de 2000 (BRASIL, 2000). Em 2004, esta portaria foi revisada, passando a vigorar a Portaria nº 518, que “estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências” (BRASIL, 2004a).

Através do artigo 7º (BRASIL, 2004a), fica estabelecido como deveres e obrigações das Secretarias de Saúde municipais interpretar os dados de características das águas dos mananciais, relativos à vulnerabilidade do abastecimento de água e aos riscos à saúde da população. Além disso, conforme mencionado anteriormente (item 1.5), também cabe às Secretarias municipais de Saúde avaliar o risco à saúde humana da ocupação da bacia contribuinte ao manancial utilizado para abastecimento e o histórico das características de suas águas. Isso também é incumbência dos responsáveis pelos sistemas de abastecimento, somadas as avaliações sistemáticas das práticas operacionais e da qualidade da água distribuída e a proteção do manancial de abastecimento e de sua bacia contribuinte (artigo 9º, inciso V) (BRASIL, 2004a).

Esta Portaria (BRASIL, 2004a) determina que sejam feitas análises semestrais da água bruta, junto do ponto de captação. As análises são necessárias para avaliar a compatibilidade entre as características da água bruta e o tipo de tratamento existente, de acordo com a legislação de classificação e enquadramento de águas superficiais, descritas a seguir.

O monitoramento de cianobactérias deve ser realizado pelas empresas responsáveis pelo tratamento da água, com frequência mensal, desde que o número de células não ultrapasse 10.000 céls.mL⁻¹. Acima dessa densidade, a frequência de monitoramento deverá ser semanal. Além disso, quando o número de células exceder 20.000 céls.mL⁻¹, a análise de cianotoxinas deve ser feita na água tratada da saída da ETA e entrada das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis. A análise da microcistina é obrigatória, com concentração máxima permitida de 1 µg.L⁻¹ para água tratada. As cianotoxinas saxitoxinas e cilindrospermopsinas têm sua análise recomendada, sendo definidas as concentrações máximas, em água tratada, de 3 µg.L⁻¹ e 15 µg.L⁻¹, respectivamente (BRASIL, 2004a). A Tabela 1.2 apresenta um resumo dos parâmetros de controle referentes às cianobactérias e cianotoxinas.

Tabela 1.2 Parâmetros de controle, referentes às cianobactérias e cianotoxinas, estabelecidos pela Portaria nº 518 em água para consumo humano.

Parâmetro		Limite	Condição	Observação
Contagem de Cianobactérias		Até 10.000 cél.mL ⁻¹	Análise da água do manancial no ponto de captação	Frequência de análise: mensal
		Acima de 10.000 cél.mL ⁻¹	Análise da água do manancial no ponto de captação	Frequência de análise: semanal
Análise de cianotoxinas	Microcistina	1 µg.L ⁻¹	Quando ultrapassar 20.000 cél.mL ⁻¹	Análise obrigatória
	Cilindrospermopsina	15 µg.L ⁻¹	Quando ultrapassar 20.000 cél.mL ⁻¹	Análise recomendada
	Saxitoxina	3 µg.L ⁻¹	Quando ultrapassar 20.000 cél.mL ⁻¹	Análise recomendada

Fonte: Adaptado de Cybis *et al.* (2006).

As análises laboratoriais para o controle e a vigilância da qualidade da água, de acordo com o artigo 17º, § 3º, devem ser realizadas por laboratório que mantém programa de controle de qualidade interna ou externa ou ainda acreditado ou certificado por órgãos competentes para esse fim (BRASIL, 2004a).

Considerando que a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico, não devem ser afetados pela deterioração da qualidade das águas e que o controle da poluição está diretamente relacionado com a proteção da saúde e da melhoria da qualidade de vida, foi estabelecida a legislação ambiental Resolução 357 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) de 2005. Essa resolução “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” (CONAMA, 2005), levando em conta os usos prioritários e classes de qualidade ambiental exigidos para um determinado corpo receptor.

Cabe ressaltar que em seu artigo 38º, § 6º, fica determinado que em corpos de água utilizados para abastecimento da população, o enquadramento e o licenciamento de atividades a montante devem preservar as condições de consumo (CONAMA, 2005).

A análise de fitoplâncton faz parte dos parâmetros que devem ser avaliados para determinar a classe em que o manancial será enquadrado. Especificamente, é considerada a biomassa fitoplanctônica, através da clorofila *a* e o número de células de cianobactérias.

É importante salientar que, de acordo com a classe enquadrada, esta resolução também determina qual o processo de tratamento de água adequado à utilização do manancial para

abastecimento da população. A Tabela 1.3 apresenta as classes de enquadramento para águas doces com seus respectivos usos prioritários e os valores máximos permitidos para clorofila *a* e número de células de cianobactérias.

Embora não conste como parâmetro da legislação, o monitoramento dos demais grupos fitoplanctônicos também é importante para garantir a qualidade da água para abastecimento público. Conforme caracterizado no item 1.7.3.3, mesmo não sendo tóxicos, diversos gêneros de algas podem conferir sabor e odor desagradáveis na água, exigindo maior consumo de produtos químicos ou a incorporação de novas etapas à seqüência de tratamento. Outras algas podem interferir na filtração, por obstruírem filtros. Coloração esverdeada na água pode indicar floração de cianobactérias, mas também pode ser provocada por algas verdes (clorofíceas).

Dessa forma, a realização das análises dos parâmetros de qualidade da água deverá ser feita por laboratório que adote procedimentos de controle de qualidade analítica, conforme estabelecido pelo artigo 9º (CONAMA, 2005). Além disso, de acordo com o artigo 8º, § 2º, os resultados do monitoramento da qualidade da água deverão ser analisados estatisticamente e as incertezas de medição consideradas (CONAMA, 2005).

Recentemente, a FEPAM/RS passou a exigir, através da Portaria nº 035/2009 (FEPAM, 2009), o cadastramento de laboratórios de análises ambientais junto ao órgão, para que os laudos da análises exigidas por ele sejam aceitos. Essa medida surge para garantir a confiabilidade analítica dos resultados de análises, conforme evidenciado nas legislações anteriores. Além disso, para receber o Certificado de Cadastro, os laboratórios devem ser vistoriados pela FEPAM ou ter parâmetros acreditados pelo Instituto Nacional de Metrologia,

Tabela 1.3 Classes de enquadramento das águas doces, usos preponderantes e valor máximo permitido (VMP) para clorofila e cianobactérias.

Classe	Usos preponderantes	Tipo de tratamento para abastecimento público	Cianobactérias VMP (céls.mL ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> VMP (µg.L ⁻¹)
Especial	- abastecimento público; - preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; - preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.	Desinfecção (remoção ou inativação de organismos potencialmente patogênicos)	---	---
1	- abastecimento público; - proteção das comunidades aquáticas; - recreação de contato primário (natação, mergulho, esqui aquático).	Simplificado (clarificação por meio de filtração e desinfecção, correção de pH se necessário)	20.000	10
2	- abastecimento público; - proteção das comunidades aquáticas; - recreação de contato primário; - irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer (contato direto).	Convencional (clarificação com utilização de coagulação e floculação, desinfecção e correção de pH)	50.000	30
3	- abastecimento público; - irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; - pesca amadora; - recreação de contato secundário; - dessedentação de animais.	Convencional ou avançado (técnicas de remoção e/ou inativação de constituintes refratários dos processos convencionais de tratamento, os quais podem conferir à água características, tais como cor, odor, sabor, atividade tóxica ou patogênica)	100.000	60
4	- navegação; - harmonia paisagística.	---	---	---

Fonte: CONAMA (2005).

Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) ou órgão que mantenha reconhecimento mútuo com o INMETRO ou por Rede Metrológica de âmbito estadual. No caso de reconhecimento por Rede Metrológica, o laboratório deve dispor de um sistema de reconhecimento da competência de laboratórios com base nos requisitos da norma NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a) e/ou Boas Práticas de Laboratório.

1.9 Técnicas para quantificação do fitoplâncton

A contagem do fitoplâncton na água é realizada por subamostra, uma vez que não é possível contar-se todos os organismos que se encontram em uma amostra. São, pois, processos sujeitos a erros, tanto maiores quanto menores forem os cuidados tomados e quanto mais rapidamente são realizados. Por outro lado, na prática diária de controle de fitoplâncton em águas de abastecimento público, torna-se necessário proceder às várias técnicas com certa rapidez a fim de assegurar um ritmo indispensável que permita suprir a grande demanda de análises contínuas. Além disso, esses trabalhos fornecem dados que serão comparados com limites impostos em legislação, permitindo avaliar as variações das condições dos ambientes. Não interessa uma precisão muito grande, com respeito a valores absolutos, sendo perfeitamente admissíveis erros da ordem de 20% e até mais, em avaliações dessa natureza. Procura-se, por outro lado, simplificar os métodos de contagem a fim de se realizar contagens rápidas (BRANCO, 1986).

A contagem do fitoplâncton é realizada em duas etapas. A primeira etapa é o registro dos organismos presentes na amostra, correspondendo à análise qualitativa. A segunda etapa é a contagem propriamente dita, ou seja, a análise quantitativa.

1.9.1 Ensaio Qualitativo

A análise qualitativa é fundamental para o estudo do fitoplâncton como um todo. A correta identificação dos organismos, apenas nos grandes grupos ou até mesmo em nível de gênero e/ou espécie, é a base para uma correta quantificação dos mesmos.

Antes de iniciar a contagem, deve ser feita uma listagem de todos os tipos de organismos presentes na amostra. Essa identificação qualitativa pode ser feita através da preparação de lâmina e lamínula ou utilizando a câmara de contagem, desde que toda a sua extensão seja observada (AWWA, 1970; BRANCO, 1986; CETESB, 2005). Para isso, pode ser utilizada amostra natural, concentrada por rede de plâncton no momento da coleta (BRANCO, 1986; CETESB, 2005; APHA; AWWA; WEF, 2005) ou por procedimentos de concentração de amostras para quantificação, descritos a seguir (item 2.5.2). É importante salientar que nessa etapa deve ser utilizada amostra viva, sem nenhum preservante. Muitas características importantes para a identificação, como mobilidade e visualização de estruturas, são observadas somente nos organismos vivos (CETESB, 2005).

A identificação dos organismos requer formação especializada do analista, quer seja em nível acadêmico (graduação, mestrado ou doutorado na área das Ciências Biológicas), quer seja em cursos específicos para identificação dos diferentes grupos de algas. Treinamentos com analistas experientes e especialistas em ficologia também são importantes, assim como uso de material bibliográfico especializado. Cabe salientar que não serão indicadas chaves de identificação, nem referências específicas, pois o material bibliográfico a ser utilizado depende da amostra analisada, da finalidade da análise e do rigor de classificação da análise qualitativa (nível de espécie, nível de gênero, entre outros).

Além do registro dos organismos presentes, pode-se avaliar a abundância relativa dos organismos na amostra (TORGAN; AGUIAR, 1978), associando-se aos resultados de abundância absoluta. A escala de abundância relativa compreende espécies raras (5 a 10% dos organismos), escassas (10 a 20% dos organismos), freqüentes (20 a 50% dos organismos), abundantes (50 a 80% dos organismos) e predominantes (80 a 100% dos organismos). Os organismos devem ser contados, mas não é possível expressar o resultado em densidade, pois o volume coletado pode ser desconhecido (em casos de concentração com rede de plâncton, por exemplo).

Também é possível comparar locais de coleta distintos, através de índice de constância dos organismos (AVILA *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2005). Esses índices levam em consideração o número de locais onde o organismo ocorre em relação a todos os locais amostrados. Os organismos são classificados como constantes, freqüentes, esporádicos e raros.

1.9.2 Concentração de amostras

Em virtude do pequeno volume de amostra que algumas câmaras de contagem são capazes de conter, as amostras com baixa densidade fitoplânctônica devem ser concentradas em etapa anterior à contagem. As amostras podem ser concentradas por filtração, sedimentação ou centrifugação. Recomenda-se o uso da sedimentação, em função de ser um método não seletivo e não destrutivo, embora seja necessário longo tempo para sedimentar grandes volumes de amostra. A filtração pode distorcer as formas de algas flageladas delicadas e seleciona somente os organismos com tamanho maior do que a porosidade do meio filtrante.

A centrifugação também pode danificar organismos frágeis (BRANCO, 1986; LAWTON *et al.*, 1999; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005).

A filtração pode ser realizada por membrana filtrante com diâmetro de poro de 0,45 μm e com auxílio de bomba de vácuo. Esta técnica permite grandes concentrações, auxiliando na contagem de organismos com tamanho reduzido. Também é indicada para concentrar amostras com baixa densidade de fitoplâncton (APHA; AWWA; WEF, 2005). Outra maneira de realizar a filtração é através de areia fina em um filtro especial, denominado *funil de Sedgwick-Rafter* (BRANCO, 1986). Na saída do filtro é colocado um disco de tecido de malha fina (o mesmo utilizado em redes de plâncton) e sobre ele, uma camada de 10 a 12 mm de areia fina (passante em peneira nº 60 e retida em peneira nº 120). O filtro é conectado a uma bomba de vácuo e tem a capacidade para filtrar um volume de 500 mL de amostra. Após encerrada a filtração, a areia e o disco de tecido devem ser lavados até obter a concentração desejada (geralmente 5 mL ou 10 mL).

A sedimentação consiste em uma série de etapas de transferência de sedimento entre uma seqüência de colunas menores até obter a concentração final desejada. O volume concentrado varia inversamente com a concentração de organismos e a turbidez da amostra. APHA, AWWA e WEF (2005) recomenda 1 hora de sedimentação para cada milímetro de profundidade da coluna e ASTM (2004), 4 horas para cada centímetro de coluna. Apesar de ser o método mais indicado para concentração de amostras (ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005), a sedimentação pode não ser completa para muitos organismos de tamanho pequeno – nanoplâncton, de acordo com Dussart (1965) – e flagelados com movimento ativo em amostras não preservadas (APHA; AWWA; WEF, 2005).

A centrifugação é a maneira de acelerar a sedimentação, embora possa danificar organismos mais delicados. O volume a ser concentrado, assim como na sedimentação, depende da concentração de organismos na amostra. A centrifugação de 100 mL de amostra deve ser realizada a 2500 rpm durante 20 minutos (APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005). A retirada do sobrenadante deve ser feita de forma suave e lenta para não revolver o material sedimentado no fundo do tubo de centrífuga. A concentração final é determinada pela relação entre o volume de sobrenadante retirado e o volume restante de amostra.

1.9.3 Ensaio Quantitativo

A quantificação do fitoplâncton pode ser realizada através de diversos métodos diretos ou indiretos. Dentre eles estão os métodos de microscopia, estimativa de biomassa, autofluorescência da clorofila *a*, métodos moleculares e os métodos que utilizam contagem de partículas. Dos métodos que serão aqui tratados, os de microscopia receberão maior ênfase do que os demais, pois dentre eles está o método de Sedgwick-Rafter, objeto de pesquisa desta tese.

1.9.3.1 Métodos diretos

Os métodos diretos de quantificação do fitoplâncton são aqueles em que se faz a contagem dos organismos propriamente ditos com o auxílio do microscópio. O método mais simples de contagem do fitoplâncton é o método de Lackey (BRANCO, 1986; APHA; AWWA; WEF, 2005). Utiliza lâmina e lamínula comuns de microscopia e microscópio óptico comum. Este

método é indicado para contagem de organismos visualizados com objetivas de imersão (aumento de 1000 vezes) e amostra com alta densidade fitoplanctônica. Sobre a lâmina coloca-se uma gota de apenas 1/20 a 1/24 mL de amostra e cobre-se, cuidadosamente, com lamínula de vidro (BRANCO, 1986). A gota deve espalhar-se uniformemente por toda área da lamínula, sem extravasar e sem reter bolhas de ar. Conhecendo-se o volume de amostra e a área da lamínula, podem-se quantificar os organismos presentes na amostra.

O método de Kolkwitz (BRANCO, 1986) utiliza amostras preservadas com solução de Lugol, concentradas conforme descrito anteriormente, e câmaras de contagem com capacidade de 1 a 10 mL. Como essas câmaras são espessas ou altas, não é possível a aproximação suficiente de uma objetiva de capacidade média para observação e contagem dos organismos presentes no fundo da câmara. Por isso, foi idealizado por Utermöhl o microscópio invertido, que permite a observação através do fundo da câmara. Assim, este método foi substituído pelo de Utermöhl e pelas câmaras que levam o mesmo nome, conforme descrição adiante.

Uma variante do método de Kolkwitz é o método de Lund (BRANCO, 1986). Este método requer o uso de microscópio comum e a sedimentação da amostra é feita na própria câmara de contagem. As câmaras são constituídas por um anel de vidro com 1 ou 2 cm de diâmetro e com altura variável. Um tubo de sedimentação de vidro deve ser ajustado e fixado ao anel. A amostra é colocada dentro do tubo e a ela são adicionadas gotas de Lugol. Para ocorrer a sedimentação dos organismos no fundo da câmara, deve-se esperar cerca de 3 horas. Após o tempo de sedimentação, retira-se a amostra do tubo através de um sifão, restando apenas o anel de vidro cheio. O tubo de sedimentação também deve ser retirado e, no seu lugar, coloca-se uma lamínula para cobrir o anel. A amostra está pronta para ser contada utilizando microscópio comum.

Para a contagem de organismos muito pequenos, pertencentes ao nanoplâncton – 2 a 20 μm , segundo DUSSART (1965) –, utiliza-se a célula de Palmer-Maloney (Figura 1.5).

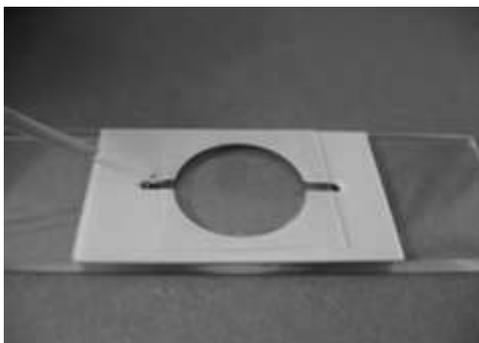


Figura 1.5. Célula de Palmer-Maloney. Fonte: LeGresley; McDermott (2010).

Esta célula tem capacidade para 0,1 mL de amostra e consiste em uma câmara circular de 17,9 mm de diâmetro e altura de 0,4 mm coberta por uma lamínula de vidro. O nível de detecção é de 10 céls.mL⁻¹ (LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010). A pequena profundidade da câmara permite o uso de objetivas de maiores aumentos (40 vezes ou mais) em microscópio óptico comum (AWWA, 1970; BRANCO, 1986; APHA; AWWA; WEF, 2005).

Esta câmara é adequada para quantificar florações, amostras de rede (que são amostras com alta densidade de organismos) e, também, cultivos. É um método de baixo custo e rápido pelo qual toda a comunidade fitoplanctônica pode ser observada. No entanto, não é adequada para a contagem de organismos grandes (maiores de 150 μm) nem formadores de colônias filamentosas (LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010).

Há também as câmaras utilizadas, primeiramente, para contagem de células sanguíneas, o hemocitômetro (APHA; AWWA; WEF, 2005). Indicada para contagem de nanoplâncton de

amostras com alta densidade de organismos (como cultivos), essa câmara, também chamada de câmara de Neubauer, é composta por duas cavidades, com 0,1 mm de profundidade, e capacidade para 0,0009 mL cada (LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010).

Visto que a contagem de cianobactérias está determinada em legislações, é preciso ter métodos de contagem eficientes para esse fim. Atualmente, duas técnicas para contagem de fitoplâncton são preferencialmente utilizadas. Uma é o método de sedimentação, conhecido como técnica de Utermöhl (LAWTON *et al.*, 1999; CEN, 2006; EPA, 2007; EDLER; ELBRÄCHTER, 2010) e a outra é a técnica de contagem de Sedgwick-Rafter (BRANCO, 1986; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005; LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010).

A técnica de Utermöhl utiliza câmaras de sedimentação, com capacidade para até 100 mL (Figura 1.6), amostras preservadas e microscópio invertido. A sedimentação das câmaras é demorada, sendo recomendados diferentes tempos de sedimentação por centímetro de câmara (Tabela 1.4).

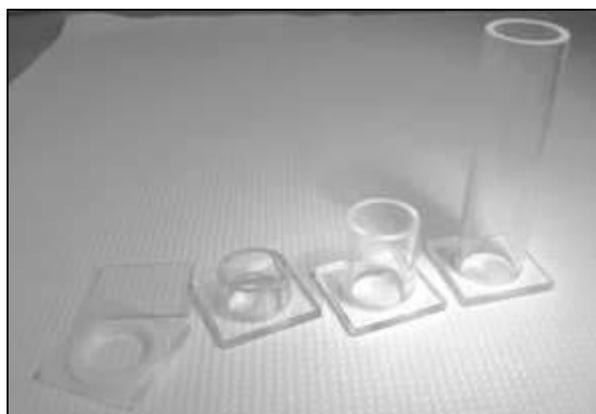


Figura 1.6. Câmaras de Utermöhl. Fonte: Edler; Elbrächter (2010).

Tabela 1.4 Tempos de sedimentação para as câmaras de Utermöhl.

Tempo de sedimentação por centímetro de altura da câmara	Autor
1,5 horas	Lund <i>et al.</i> (1958)
3 horas	Utermöhl (1958)
4 horas	Nauwerk (1963)
4 horas	Willen (1976)
3 a 4 horas	Lawton <i>et al.</i> (1999)

O microscópio invertido permite que sejam utilizadas câmaras altas, como as com capacidade para 100 mL que tem 20 cm de altura, pois as objetivas focam a amostra através da parte inferior (fundo) da câmara.

Nesta técnica, a concentração da amostra é realizada diretamente na câmara, sendo que quanto menor for a concentração de organismos na amostra, mais alta deverá ser a câmara. Como a concentração da amostra é baseada nos princípios da sedimentação, implica que os organismos sejam mais densos que a água para poderem sedimentar. Por isso a necessidade do uso de preservantes. Há opções de preservantes que podem ser utilizados (Tabela 1.5), cada um com suas vantagens e desvantagens, no entanto, a solução de Lugol é mais utilizada. Entretanto, todos eles compartilham de uma mesma desvantagem: provocam a morte dos organismos.

O método de Utermöhl é, provavelmente, o método mais utilizado para identificação e contagem do fitoplâncton; porém apresenta desvantagens: consome muito tempo para análise e tem alto custo (EDLER; ELBRÄCHTER, 2010).

Tabela 1.5 Soluções para preservação de amostras para análise de fitoplâncton.

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

Fonte: CETESB (2005).

O método da garrafa de sedimentação é uma modificação da técnica de Utermöhl (MCDERMOTT; RAINE, 2010). A contagem de organismos da amostra é realizada em uma garrafa plástica de cultura de células, com capacidade para 50-60 mL. A amostra deve ser homogeneizada e deixada sedimentar na própria garrafa, a qual é colocada diretamente no microscópio invertido para proceder à quantificação. Este método minimiza erros de sub-amostragem, pois coleta, preservação e contagem ocorrem na mesma garrafa.

A técnica de contagem de Sedgwick-Rafter recebe o mesmo nome das câmaras que são aqui empregadas. Esta será a técnica utilizada para contagem do fitoplâncton no presente trabalho. A câmara de Sedgwick-Rafter (S-R) tem volume fixo (Figura 1.7), com capacidade para 1 mL, e é constituída por uma célula central, medindo 50 mm de comprimento, 20 mm de largura e 1 mm de profundidade (AWWA, 1970; BRANCO, 1986; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005; LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010). Esta técnica utiliza amostras preservadas, microscópio óptico comum e amostras concentradas por um dos procedimentos

descritos anteriormente. O tempo de sedimentação da amostra também pode variar com os autores, conforme Tabela 1.6.

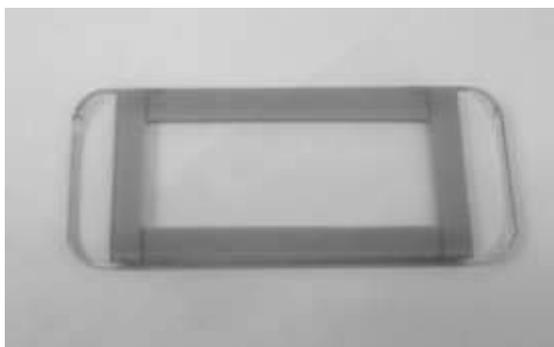


Figura 1.7. Câmara de Sedgwick-Rafter. Fonte: Foto do Autor.

Tabela 1.6 Tempos de sedimentação para as câmaras de Sedgwick-Rafter.

Tempo de sedimentação	Autor
7 minutos	Woelkerling, Kowal e Gough (1976)
24 minutos	ASTM (2004)
15 minutos	APHA; AWWA; WEF (2005)
15 minutos	LeGresley e McDermott (2010)

Ao preparar a câmara para contagem, ela deve estar em local plano e livre de movimento. Uma lamínula de vidro é colocada em diagonal sobre a câmara e, com auxílio de uma pipeta, preenche-se toda a câmara por um dos cantos abertos. Quando completamente preenchida, a lamínula tende a deslizar e fechar a câmara. Se isso não ocorrer, delicadamente deve-se fechar a câmara e secar o excesso de amostra extravasado. Aguardar o tempo de sedimentação da amostra e proceder à contagem.

Independente do método de contagem adotado, o uso do retículo de Whipple (Figura 1.8) na ocular do microscópio é recomendado (PALMER, 1962; AWWA, 1970; BRANCO, 1986; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005).

O retículo de Whipple consiste em um quadrado dividido em 100 quadrados menores, sendo um destes, em posição central, subdividido em 25 quadrados ainda menores. A área total é de 1 mm^2 e as dimensões internas estão representadas na Figura 1.8. O retículo é utilizado para delimitar o campo de contagem e para realizar medições de comprimento e área dos organismos. Por isso, deve-se realizar a calibração do retículo para estabelecer as suas reais dimensões (Figura 1.9).

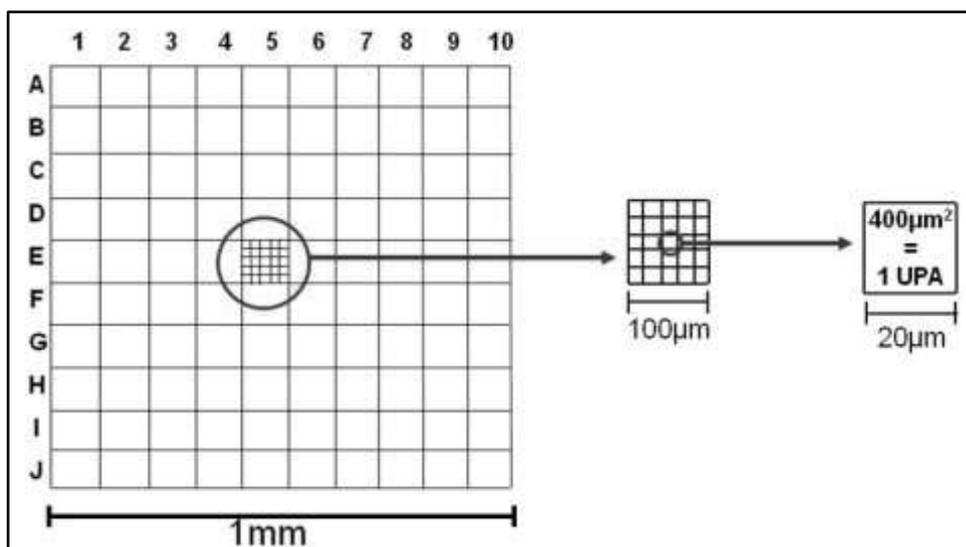


Figura 1.8. Representação esquemática do retículo de Whipple. Fonte: Esquema do autor.

A calibração é feita através de um micrômetro, colocado na platina do microscópio. O micrômetro é uma régua, geralmente medindo 1 mm, em uma lâmina de vidro, que deve estar calibrado. Alternativamente, pode-se contratar serviço externo de calibração do retículo de Whipple. Focaliza-se o micrômetro no microscópio e devem ser estabelecidos os pontos de

coincidência entre os lados do retículo e as divisões do micrômetro. Assim são estabelecidas as reais dimensões do retículo no microscópio em que está equipado (APHA; AWWA; WEF, 2005).

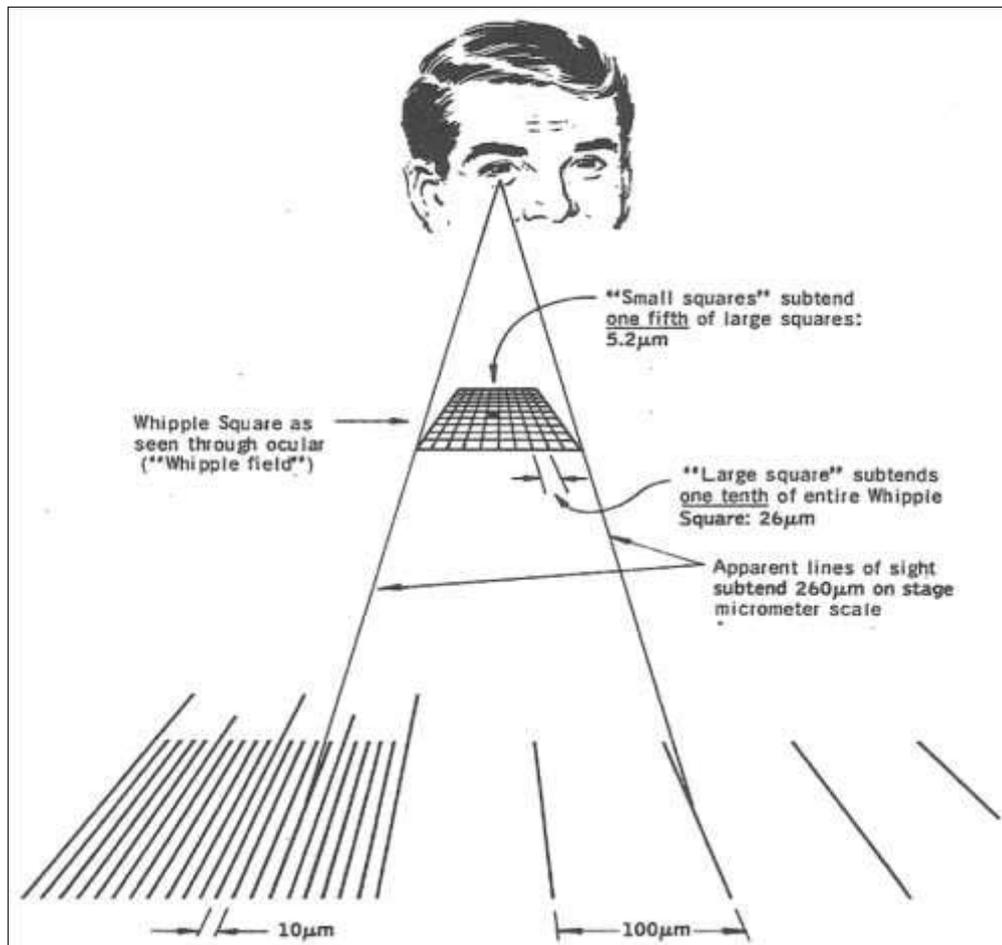


Figura 1.9. Representação da calibração do retículo de Whipple com o micrômetro.
Fonte: APHA; AWWA; WEF (2005).

Dependendo da concentração de organismos na amostra, procede-se a contagem em campos ou transectos. Os campos correspondem à área do retículo de Whipple e os transectos são faixas verticais ou horizontais ao longo da câmara de contagem. O número de campos ou transectos que serão contados dependerá da densidade de organismos presentes na amostra, do tempo e esforço disponível do analista para a execução do ensaio.

Especificamente para a técnica de Sedgwick-Rafter, o cálculo do número de células é feito de acordo com as seguintes fórmulas (APHA; AWWA; WEF, 2005):

- contagem de transectos:

$$n^{\circ} \text{ células. ml}^{-1} = \frac{C \times 1000 \text{ mm}^3}{L \times D \times W \times S}$$

Sendo:

- C: número de células contadas;
- L: comprimento do transecto (comprimento da câmara de S-R), mm;
- D: profundidade do transecto (profundidade da câmara de S-R), mm;
- W: largura do transecto (largura do retículo de Whipple), mm;
- S: número de transectos contados.

- contagem de campos:

$$n^{\circ} \text{ células. ml}^{-1} = \frac{C \times 1000 \text{ mm}^3}{A \times D \times F}$$

Sendo:

- C: número de células contadas;
- A: área do campo (área do retículo de Whipple), mm²;
- D: profundidade do campo (profundidade da câmara de S-R), mm;
- F: número de campos contados.

De acordo com Margalef (1983), no fundo de uma câmara de sedimentação, os organismos se distribuem ao acaso, e sua contagem, seguirá a distribuição de Poisson. Assim, o erro de contagem do método pode ser estimado, conforme APHA; AWWA; WEF (2005).

$$\text{Erro (\%)} = \left(\frac{2}{\sqrt{N}} \right) \times 100$$

Sendo N igual ao número de indivíduos contados na câmara S-R.

A agilidade na quantificação do fitoplâncton pela técnica de Sedgwick-Rafter é obtida pela concentração da amostra através da centrifugação e pelo curto tempo de sedimentação da câmara.

Segundo Woelkerling, Kowal e Gough (1976), o tempo de sedimentação da câmara depende do tipo de preservante e do tipo de organismo. Para amostras preservadas com solução de Lugol, os autores constataram que um tempo de 7 minutos é suficiente (Tabela 1.6), pois o Lugol facilita a sedimentação em função do alto peso molecular do iodo presente na solução e por acelerar a liberação de gás das células de determinadas algas. Os autores também discutem que algas com grande razão superfície/volume ou com vacúolos de gás demoram mais para sedimentar do que algas que não apresentam estas características.

É consenso que as análises microscópicas são demoradas, requerem analistas especializados e a qualidade e confiabilidade dos resultados estão estreitamente relacionada com a capacidade do analista e com seu bom conhecimento da taxonomia dos organismos (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998; GREGOR *et al.*, 2005; THYSSEN *et al.*, 2008; EDLER; ELBRÄCHTER, 2010; MCDERMOTT; RAINE, 2010).

Na tentativa de automatizar a contagem do fitoplâncton, Embleton, Gibson e Heaney (2003) compararam a contagem pelo método de Utermöhl com análise de imagens obtidas diretamente de amostras de água, sendo determinadas medidas como área, perímetro, comprimento e diâmetro dos organismos. Os resultados mostraram que a repetição da contagem de células pelo sistema automatizado apresentou maior variabilidade do que a

contagem microscópica, indicando que a análise convencional possui maior grau de precisão dos resultados.

1.9.3.2 Métodos indiretos

Além da contagem microscópica dos organismos presentes na amostra, utilizam-se métodos indiretos para estimativa da biomassa fitoplanctônica. A determinação de clorofila *a* está baseada na extração do pigmento das células presentes na amostra e posterior leitura do extrato obtido em espectrofotômetro na faixa visível do espectro eletromagnético. Juntamente com a clorofila *a*, estima-se a concentração de feofitina *a*, pigmento resultante da degradação da clorofila que absorve luz no mesmo comprimento de onda e pode interferir nos cálculos da concentração da clorofila *a* (MARGALEF, 1983; ISO, 1992; CETESB, 2005; APHA; AWWA; WEF, 2005).

Existem diversos protocolos de análise, mas em todos deve-se proceder a filtração da amostra em filtro de fibra de vidro e extração do pigmento através do uso de solvente sob refrigeração. A leitura em espectrofotômetro deve ser realizada nos comprimentos de onda de 664 nm e 665 nm, para métodos monocromáticos, onde determinam-se as concentrações de clorofila *a* e feofitina *a* (ISO, 1992; CETESB, 2005; APHA; AWWA; WEF, 2005). Em métodos tricromáticos, onde são determinadas as concentrações de clorofila *a*, *b* e *c* e feofitina *a*, a leitura é realizada nos comprimentos de onda 630 nm, 647 nm, 664 nm e 665 nm (CETESB, 2005; APHA; AWWA; WEF, 2005). Os diferentes comprimentos de onda são utilizados em função das particularidades de cada grupo fitoplanctônico. Eles possuem diferentes pigmentos

e em concentrações diferenciadas, cada grupo respondendo em determinados comprimentos de onda.

De acordo com Gregor e Maršálek (2004), esses métodos de determinação da clorofila *a* utilizados na rotina por décadas são demorados e requerem procedimentos de amostragem, assim como analistas treinados. Além disso, todas as etapas do ensaio, desde a amostragem até a determinação final da clorofila *a*, estão sujeitas a variabilidade. Outras desvantagens são o grande volume de amostra e a possibilidade de variação quantitativa durante o armazenamento da amostra.

Quando o interesse na quantificação é por apenas um grupo de algas, por exemplo cianobactérias, a determinação através dos pigmentos fotossintetizantes está sujeita à interferência da clorofila *a* de outros grupos fitoplanctônicos. Lawton *et al.* (1999) sugerem a utilização desse método para a estimativa da biomassa de cianobactérias nas amostras em que forem maioria ou organismos dominantes.

A biomassa fitoplanctônica também pode ser determinada através do cálculo do biovolume. Utilizando análise microscópica, determina-se a forma geométrica da célula e são medidas as dimensões de largura, comprimento e espessura. Assim, multiplica-se pela contagem total de células para se obter o biovolume final da amostra (HILLEBRAND *et al.*, 1999; CETESB, 2005; EPA, 2007). A contagem dos organismos pode ser realizada, em microscópio óptico, de maneira convencional ou automatizada (GOSSELAIN; HAMILTON, 2000; GOSSELAIN; HAMILTON; DESCY, 2000), como também pode ser realizada em microscópio confocal (LARSON; PASSY, 2005).

Na tentativa de utilizar uma ferramenta simples para o monitoramento da densidade fitoplanctônica, a autofluorescência da clorofila *a*, medida através de um espectrofluorômetro submersível (BEUTLER *et al.*, 2002; LEBOULANGER *et al.*, 2002; GREGOR *et al.*, 2005; PARÉSYS *et al.*, 2005; GAEVSKY, *et al.*, 2005) vem sendo utilizada para a identificação e contagem do fitoplâncton. Este método é baseado na diferença existente no espectro de excitação/emissão dependendo do pigmento presente nas células fitoplanctônicas, o que pode ser utilizado na classificação dos grupos algais (GREGOR *et al.*, 2005). A coloração das algas é um critério taxonômico útil e os grupos taxonômicos diferem significativamente em seu espectro de excitação de fluorescência (BEUTLER *et al.*, 2002). Rodenacker *et al.* (2006) desenvolveram um sistema automatizado para identificação e quantificação do fitoplâncton utilizando microscópio invertido com epifluorescência. O sistema capta imagens dos organismos baseado na autofluorescência da clorofila e dos demais pigmentos acessórios.

Embora reduzindo o tempo de análise e aumentando a velocidade de trabalho, os métodos de fluorescência têm resolução taxonômica baixa e os resultados podem ser afetados pela variação na composição e concentração de pigmentos entre espécies do mesmo grupo taxonômico e pela interferência da fluorescência de partículas não-algais (detritos) presentes no ambiente (HENSE, *et al.*, 2008).

A metodologia FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*) utiliza microscópio com epifluorescência e marcadores moleculares de fluorescência. Os marcadores devem ser específicos para RNA ribossômico do organismo de interesse, sendo as posições mais conservadas da molécula de RNA utilizadas para desenvolver marcadores em nível de classe, por exemplo, e as regiões variáveis, usadas para níveis mais baixos, como espécie. As limitações da metodologia são alto custo inicial, pessoal com experiência em biologia

molecular e disponibilidade de marcadores para um número limitado de espécies (TÖBE *et al.*, 2010).

Outras técnicas moleculares para quantificação de fitoplâncton, como reação da polimerase em cadeia (GALLUZZI; PENNA, 2010), hibridização em sanduíche (MARIN III; SCHOLIN, 2010), microarranjo de DNA (GESCHER; METFIES; MEDLIN, 2010) ou detecção eletroquímica em biosensores (DIERCKS; METFIES; MEDLIN, 2010) ainda estão em desenvolvimento, encontrando-se muitas delas na fase de protótipos. Além disso, há marcadores moleculares para um número limitado de espécies, sendo necessária a utilização de outras técnicas para complementar o estudo.

A citometria de fluxo tem sido uma metodologia bastante estudada para utilização em avaliações temporais e espaciais da comunidade fitoplanctônica marinha (THYSSEN *et al.*, 2008). É uma metodologia adequada para estudo do picoplâncton, pois são difíceis de observar e quantificar através das técnicas microscópicas, devido ao seu reduzido tamanho; e também pode ser utilizada para isolar espécies previamente identificadas por microscopia (CELLAMARE; ROLLAND; JACQUET, 2010). Os equipamentos desenvolvidos para essa metodologia são capazes de quantificar partículas através da dispersão da luz (emitida por um laser) e de fluorescência. Quando as partículas passam pelo feixe de laser, a dispersão da luz fornece informações sobre composição e distribuição do tamanho das partículas, enquanto os dados de fluorescência permitem diferenciar o fitoplâncton de outras partículas e identificar os grandes grupos fitoplanctônicos. (DUBELAAR *et al.*, 1999; FRANQUEIRA *et al.*, 2000; DUBELAAR; GERRITZEN, 2000; OLSON; SHALAPYONOK; SOSIK, 2003; SOSIK *et al.*, 2003).

A classificação do fitoplâncton é feita em 4 grupos espectrais, a saber: (1) Verde, compreende as clorofíceas, com clorofilas *a* e *b*; (2) Azul, inclui as cianobactérias, com ficocianina; (3) Marrom, diatomáceas e dinoflagelados, predominando clorofilas *a* e *c*; (4) Misto, são as criptofíceas, contendo clorofilas *a* e *c*, além de ficobilinas (BEUTLER *et al.*, 2002; GREGOR; MARŠÁLEK, 2004; GREGOR *et al.*, 2005). O equipamento pode ser calibrado com culturas de algas ou por parâmetros definidos pelo fabricante. Além da classificação taxonômica preliminar do fitoplâncton, esse equipamento pode ser utilizado para quantificação, em μg de clorofila *a* por mL de amostra (GREGOR *et al.*, 2005).

Alguns equipamentos possuem, adicionalmente, captura de imagens dos organismos para identificação, além de medir parâmetros celulares como comprimento, largura, diâmetro e fluorescência. A identificação de grupos ou gêneros algais depende de uma biblioteca de imagens criada previamente pelo usuário do equipamento (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998; OLSON; SOSIK, 2007; POULTON; MARTIN, 2010). Na prática, em rotinas de monitoramento, esses métodos ainda não são adequados, pois a necessidade de calibração dos equipamentos com culturas monoespecíficas inviabiliza sua utilização fora do âmbito da pesquisa. A manutenção de cultivos não é uma tarefa fácil e a calibração utilizando poucas espécies pode ser inadequada para análise de mananciais com comunidades fitoplanctônicas diversas. Além disso, o custo inicial desses equipamentos é elevado, aproximadamente, US\$ 80.000, segundo Poulton e Martin (2010).

1.10 Garantia da qualidade e confiabilidade analítica de resultados

Atualmente, a qualidade, e o seu entendimento, é uma necessidade para o bom funcionamento e excelência de qualquer atividade humana direcionada para o mercado, qualquer que seja o seu tamanho. A qualidade gera competitividade e confiança por parte das organizações em oferecer aos seus clientes produtos ou serviços que atendam a todos os requisitos pré-estabelecidos por eles e que passaram por um processo de melhoria contínua, rastreável e eficaz.

O sucesso de uma organização pode resultar da implantação e manutenção de um sistema de gestão, dentre eles, o sistema de gestão da qualidade, concebido para melhorar continuamente o desempenho, levando em consideração, ao mesmo tempo, as necessidades de todas as partes interessadas. A abordagem do sistema de gestão da qualidade incentiva as organizações a analisar os requisitos do cliente, definir os processos que contribuem para a obtenção de um produto ou serviço que é aceitável para o cliente e manter estes processos sob controle. Um sistema de gestão da qualidade pode fornecer a estrutura para melhoria contínua com o objetivo de ampliar a probabilidade de satisfação do cliente e de todos os envolvidos. Ele fornece confiança à organização e a seus clientes de que ela é capaz de fornecer produtos ou serviços que atendam os requisitos de forma consistente (ABNT, 2005b; ABNT, 2008).

Nesse sentido e ainda em função da contagem celular de cianobactérias constar nas legislações, os métodos de contagem devem fornecer resultados precisos, exatos e confiáveis. De acordo com a NBR ISO/IEC 17025, “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” (ABNT, 2005a), os laboratórios que pretendem ser reconhecidos

como capacitados tecnicamente para realizar ensaios específicos, devem garantir a confiabilidade analítica dos ensaios realizados.

A avaliação qualitativa dos organismos fitoplanctônicos também requer precisão e confiabilidade. Caso contrário, a análise quantitativa pode ser comprometida. Não é qualquer analista de laboratório que tem condições de realizar essa etapa da análise. Em função disso, é notável a escassez desses profissionais no mercado de trabalho brasileiro. O analista deve ter formação profissional na área das Ciências Biológicas e treinamentos específicos para correta identificação e classificação dos organismos nos grandes grupos fitoplanctônicos. A habilitação desse profissional requer muito tempo de treinamentos teóricos e práticos, sendo que reciclagens e atualizações constantes são necessárias. Além disso, ele precisa ter disponíveis referências bibliográficas especializadas para apoio e consulta, bem como materiais e equipamentos adequados à sua atividade. Todos esses requisitos devem ser atendidos pelos laboratórios acreditados pela norma NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a). Isso reforça, novamente, a importância dessas credenciações para a confiabilidade analítica dos resultados de ensaio.

O resultado de uma medição é, em geral, uma estimativa do valor do objeto de medição. Desta forma, a apresentação do resultado é completa somente quando acompanhada por uma quantidade que declara sua incerteza, ou seja, a dúvida ainda existente no processo de medição. Do ponto de vista técnico, quando realizamos uma medição, esperamos que ela tenha exatidão (mais próxima do valor verdadeiro) e que apresente características de repetitividade (concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas sob as mesmas condições) e reprodutibilidade (concordância entre os resultados das medições efetuadas sob condições variadas) (RMRS, 2003).

Nesse contexto, os ensaios realizados devem ser executados de acordo com métodos normalizados, publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais, por organizações técnicas respeitáveis, em textos ou jornais científicos relevantes. Podem também ser usados métodos desenvolvidos ou adotados pelo laboratório de análise, se forem apropriados para o uso e se estiverem validados. Uma vez escolhido o método de ensaio, se este for realizado através de método normalizado utilizado fora do escopo para o qual foi concebido ou ampliações e modificações de métodos normalizados, o laboratório deverá validar seu método.

A preocupação com a escolha do método reflete, em última instância, na qualidade do resultado final da medição. A NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a) contém os requisitos que os laboratórios de ensaio e de calibração devem atender se desejarem demonstrar que tem implantado um sistema de qualidade, que são tecnicamente competentes e que são capazes de reproduzir resultados tecnicamente válidos e com confiabilidade analítica.

Ainda segundo a norma NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a), “Validação de métodos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. De acordo com Bruce, Minkkinen e Riekkola (1998), o processo de validação pode ser realizado através de checagens básicas ou testes trabalhosos, dependendo do propósito do método a ser validado e do nível de qualidade associado.

Os passos necessários para a Validação de Métodos Laboratoriais incluem o estudo dos seguintes parâmetros, quando aplicáveis, requeridos como evidência objetiva da validação do método analítico: especificidade e seletividade, estabilidade, sensibilidade, faixa de trabalho,

limite de detecção e limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, incerteza de medição e robustez (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; INMETRO, 2010; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

Nesse contexto, será proposta a validação do método de Sedgwick-Rafter, para contagem do fitoplâncton, utilizando amostras sem preservação, uma vez que o método normalizado requer análise quantitativa em amostras preservadas (conforme item 1.9.3.1). Nesta validação são aplicáveis os estudos dos parâmetros descritos a seguir, de acordo com Bruce, Minkkinen e Riekkola (1998), Albano e Raya-Rodriguez (2009) e INMETRO (2010).

- a) Estabilidade: a estabilidade está relacionada à variação de uma característica em um determinado período de tempo. Deve ser determinada de modo a reproduzir as reais condições de armazenamento, manuseio e análise da amostra.
- b) Exatidão: A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro. Pode ser determinada através da comparação de um método normalizado, que já foi validado anteriormente, com um método não normalizado; pela análise de materiais de referência certificados ou por participações em comparações interlaboratoriais.
- c) Limite de Detecção do Método e Limite de Quantificação do Método: O Limite de Detecção do Método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior do que zero. O Limite de Quantificação do Método (LQM) é a menor concentração de analito que pode ser determinada com nível aceitável de exatidão e precisão.

d) **Robustez:** A robustez é a suscetibilidade de um método analítico em responder a pequenas alterações das condições experimentais, as quais podem ser condições de armazenamento, ambientais, diferentes preparações da amostra ou outras pequenas alterações. Um método pode ser considerado robusto se for insensível a estas pequenas variações que possam ocorrer quando o método está sendo executado.

e) **Precisão:** A precisão reflete a concordância entre vários valores experimentais obtidos. Quanto menor a amplitude dos métodos, maior será a precisão. A precisão pode ser expressa pelo desvio padrão ou coeficiente de variação de uma série de valores de um experimento ou pelos parâmetros estatísticos de repetitividade (REPE) e reprodutibilidade (REPRO). A REPE é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurado, efetuados sob as mesmas condições de medição, chamadas condições de repetitividade, consideradas como mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo. A REPRO é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo mensurado, que podem ser amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo local, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos de análise.

f) **Incerteza de Medição:** A incerteza de medição é a dúvida remanescente associada ao resultado da medição, que caracteriza a dispersão dos valores que podem ser atribuídos a um mesmo mensurado. Ela caracteriza uma faixa de dispersão ou intervalo, e não um valor pontual. A incerteza padrão do Tipo A é aquela obtida por métodos que empregam uma análise estatística de uma série de observações repetidas no momento do ensaio. Pode ser determinada através de cartas de controle, estudos de repetitividade e reprodutibilidade, desde

que elas considerem todos os fatores significativos de influência no ensaio, inclusive processos de diluição, concentração e homogeneidade de amostras. A incerteza padrão do Tipo B é aquela herdada da calibração de equipamento, vidrarias e padrões, especificações dos equipamentos e padrões e outros métodos que não empregam a análise estatística de uma série de observações repetidas no momento do ensaio.

Assim, validar o ensaio de contagem do fitoplâncton, utilizando o método de Sedgwick-Rafter com amostras não preservadas, é estar com o objetivo voltado para a Confiabilidade Analítica do método escolhido na execução do ensaio e na obtenção do resultado. O processo de validação é a garantia experimental de que o método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

1.10.1 Detalhamento da metodologia do estudo de validação

Os parâmetros para realização do estudo de validação do método de contagem de Sedgwick-Rafter com amostras não preservadas, citados anteriormente, serão avaliados de acordo com o detalhamento a seguir.

O estudo da **estabilidade** será realizado em relação ao tipo de preservação e ao tipo de armazenamento das amostras, em duas etapas (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). A primeira envolve a comparação entre a amostra preservada com Lugol (APHA; AWWA; WEF, 2005) e a amostra viva, isto é, sem preservação, ao longo do tempo de armazenamento sob refrigeração (2°C a 6°C).

Dez conjuntos de amostras, composto por amostra viva e amostra preservada, serão analisados em duplicata. A análise das amostras será realizada imediatamente após a coleta. Em seguida, as mesmas serão armazenadas em geladeira (2°C a 6°C) e novamente analisadas nos seguintes tempos após a data da coleta: 1, 2, 3, 4 e 7 dias.

A segunda etapa consiste na comparação entre a amostra viva, mantida sem refrigeração durante 3 dias antes na análise e a amostra viva armazenada sob refrigeração (2°C a 6°C) até a análise. Dez conjuntos de amostras, compostos por amostra viva sem refrigeração e amostra viva com refrigeração serão analisados em duplicata. A análise das amostras será realizada nos seguintes tempos após a data da coleta: 3, 4 e 7 dias.

Os dados serão transformados em \log_{10} e analisados estatisticamente através de análise de variância, utilizando o software Microsoft Excel, com nível de significância de 95%. O resultado dessa análise indicará se a amostra viva fornece o mesmo resultado que a amostra preservada, em até quantos dias após a coleta e com qual tipo de armazenamento (com ou sem refrigeração).

O estudo da **exatidão** será realizado com a colaboração do Laboratório de Hidrobiologia da Divisão de Pesquisa do Departamento Municipal de Água e Esgoto (DVP-DMAE) do município de Porto Alegre. Este Laboratório foi escolhido, pois realiza a contagem do fitoplâncton através do método de Sedgwick-Rafter normalizado (APHA; AWWA; WEF, 2005). Portanto, as amostras analisadas são preservadas com Lugol.

A mesma amostra será analisada pelos dois métodos, sendo comparadas as contagens de 7 réplicas de cada um. Os resultados obtidos serão transformados em \log_{10} e analisados

estatisticamente através do Teste-*t* para variâncias equivalentes, com 95% de confiança, utilizando o software Microsoft Excel (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

Para os cálculos do **limite de detecção do método** (LDM) e do **limite de quantificação do método** (LQM) serão analisadas 7 replicatas de uma mesma amostra contendo uma baixa densidade celular de fitoplâncton. Serão calculados desvio padrão e média das replicatas (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

O LDM será calculado através da fórmula abaixo.

$$LDM = (t \times \sigma) + \bar{x}$$

Sendo:

- *t*: valor de *t* de Student com nível de confiança de 95% para 6 graus de liberdade (nº de replicatas – 1);
- σ : desvio padrão das replicatas;
- \bar{x} : média das replicatas.

O LQM será calculado através da fórmula abaixo.

$$LQM = \bar{x} + (10 \times \sigma)$$

Sendo:

- σ : desvio padrão das replicatas;
- \bar{x} : média das replicatas.

O estudo da **robustez** seguirá o procedimento proposto por Albano e Raya-Rodriguez (2009).

Os seguintes fatores, que podem causar pequenas interferências no método, foram determinados e avaliados:

- Fator 1: frasco de coleta (polietileno coberto por papel alumínio e polietileno não coberto por papel alumínio);
- Fator 2: microscópio (equipamento 1 – Olympus BX50 – e equipamento 2 – Olympus BX51);
- Fator 3: tempo transcorrido da coleta da amostra até a análise (imediatamente após a coleta e 3 dias após a coleta).

De cada uma das combinações entre os 3 fatores, em um total de 8 combinações, serão analisadas 6 replicatas. O cálculo será realizado com os dados transformados em \log_{10} , conforme os passos abaixo.

1º Passo: Calcular a média dos resultados de cada combinação;

2º Passo: Calcular a diferença entre os fatores avaliados (D). Serão obtidos três valores, um para cada fator;

3º Passo: Elevar ao quadrado a diferença de cada fator (D^2);

4º Passo: Somar as D^2 ;

5º Passo: Calcular a média (M) de D^2 ;

6º Passo: Calcular o desvio da Robustez (σ_{ROB}) da seguinte forma:

$$\sigma_{ROB} = \sqrt{2 \times M}$$

O método será considerado robusto, se o desvio da robustez (σ_{ROB}) for menor que o desvio da Reprodutibilidade (σ_{REPRO} , a seguir).

O estudo da **precisão** do método será baseado na Repetitividade (REPE) e na Reprodutibilidade (REPRO), realizadas seguindo o Estudo Formal de Repetitividade e

Reprodutibilidade proposto por Albano e Raya-Rodriguez (2009). Este estudo está baseado na avaliação da média e da amplitude, permitindo decompor a parcela da variabilidade referente à REPE e à REPRO, identificando as maiores contribuições para as possíveis variações do ensaio. A REPRO que será avaliada é a reprodutibilidade intralaboratorial, também denominada precisão intermediária, reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório.

Serão avaliados dois analistas, realizando a contagem de 20 amostras, em triplicata e em curto intervalo de tempo entre elas. Os resultados serão transformados em \log_{10} e analisados estatisticamente, obtendo-se o desvio da REPE (σ_{REPE}), o desvio da REPRO (σ_{REPRO}) e o desvio de REPE e REPRO (R&R) da seguinte maneira.

- Desvio da REPE (σ_{REPE}):

$$\sigma_{REPE} = \text{amplitude média entre analistas} / d_2$$

Sendo d_2 uma constante tabelada (Tabela 1.7) com valor igual a 1,693, considerando:

m = número de repetições = 3 (triplicata);

g = número de amostras x número de analistas (20 x 2 = 40).

Tabela 1.7. Tabela de d_2 .

g	m	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10
1		1,41	1,91	2,24	2,48	2,67	2,83	2,96	3,08	3,18	3,55
5		1,19	1,74	2,10	2,36	2,56	2,73	2,87	2,99	3,10	3,49
10		1,16	1,72	2,08	2,34	2,55	2,72	2,86	2,98	3,09	3,48
15		1,15	1,71	2,07	2,34	2,54	2,71	2,85	2,98	3,08	3,48
>15		1,128	1,693	2,059	2,326	2,534	2,704	2,847	2,970	3,078	3,472

Fonte: Adaptado de MSA (2010)

- Desvio da REPRO (σ_{REPRO}):

$$\sigma_{REPRO} = VO / 5,15$$

Sendo VO a variação da reprodutibilidade.

Deve-se descontar a parcela da variação da REPE que pode contaminar a VO, antes de calcular o desvio da reprodutibilidade. A VO é calculada de acordo com a fórmula seguinte.

$$VO = \sqrt{\left(5,15 \times \frac{R_o}{d_2}\right)^2 - \frac{(5,15 \times \sigma_{REPE})^2}{60}}$$

Sendo R_o a média das médias das contagens dos analistas e d_2 uma constante tabelada (Tabela 1.7) com valor igual a 1,41, considerando:

$m =$ número de analistas = 2;

$g = 1$.

Assim, o desvio da reprodutibilidade pode ser calculado.

- Desvio de REPE e REPRO (R&R):

$$R\&R(\%) = 100\% \times (R\&R/VT)$$

Sendo R&R a variação de REPE e REPRO e VT a dispersão do processo analítico, ou seja, sua Variação Total, calculados conforme abaixo.

$$R\&R = \sqrt{VE^2 + VO^2}$$

Sendo VO a variação da REPRO e VE a variação da REPE ($VE = 5,15 \times \sigma_{REPE}$).

$$VT = \sqrt{R\&R^2 + VA^2}$$

Sendo VA a Variação das Amostras calculada da seguinte maneira.

$$VA = \left(\textit{amplitude entre as amostras} / d_2 \right) \times 5,15$$

Em que d_2 é uma constante tabelada (Tabela 1.7) com valor igual a 3,55, considerando:

m = número de amostras = 20;

g = 1.

A faixa de aceitação para o R&R(%), de acordo com AIAG (2002) é dada pela Tabela 1.8.

Tabela 1.8. Faixa de aceitação para o R&R(%).

R&R(%)	Interpretação
< 10%	Aceitável
10% até 30%	Até pode ser aceito, mas o processo analítico necessita de melhorias
> 30%	Inaceitável

Fonte: AIAG (2002).

A **incerteza de medição** (IM) será calculada considerando-se como componentes de incerteza o desvio da REPE (σ_{REPE}) e o desvio da REPRO (σ_{REPRO}), anteriormente descritos no estudo da Precisão.

O desvio da REPE (σ_{REPE}) será utilizado para o cálculo do desvio padrão relativo da REPE (RSD_{REPE}) e o desvio da REPRO (σ_{REPRO}) será utilizado para o cálculo do desvio padrão relativo da REPRO (RSD_{REPRO}). Em seguida, as contribuições da REPE e da REPRO para a incerteza de medição do ensaio serão calculadas através da determinação das Incertezas Padrão (IP), conforme abaixo (CALA, 2010):

$$a) \text{ Desvio padrão relativo (RSD)} = \frac{\sigma}{\text{média das contagens}}$$

$$b) \text{ Incerteza Padrão (IP)} = \text{RSD} \quad (\text{IP}\%) = \text{RSD} \times 100$$

A incerteza expandida (IE), que corresponde à incerteza final do ensaio, é calculada da seguinte maneira (CALA, 2010):

- Incerteza combinada (IC) da REPRO e da REPE:

$$IC = \sqrt{(RSD_{REPRO})^2 + (RSD_{REPE})^2}$$

- Incerteza expandida (IE):

$$IE = IC \times k$$

Sendo k um fator de abrangência com valor tabelado (ABNT; INMETRO, 2003) obtido em função do grau de liberdade efetivo (v_{eff}). O fator de abrangência é um fator numérico utilizado como um multiplicador da incerteza combinada (IC) de modo a obter uma incerteza expandida (IE). O fator k permite determinar um intervalo em torno do resultado de uma medição, com o qual se espera abranger uma grande fração da distribuição de valores que poderiam razoavelmente ser atribuídos ao mensurado. A escolha do fator k é baseada na

probabilidade de abrangência ou nível da confiança requerido no intervalo, sendo utilizado 95,45% (ABNT; INMETRO, 2003).

Para calcular o grau de liberdade efetivo (v_{eff}) utiliza-se a fórmula de *Welch-Satterthwaite* como segue:

$$v_{eff} = \frac{IC^4}{\left(\frac{IP_{REPE}^4}{v_{REPE}}\right) + \left(\frac{IP_{REPRO}^4}{v_{REPRO}}\right)}$$

Sendo:

- IC: incerteza combinada da REPE e da REPRO;
- IP_{REPE} : incerteza padrão da REPE;
- IP_{REPRO} : incerteza padrão da REPRO;
- v_{REPE} : graus de liberdade do componente REPE;
- v_{REPRO} : graus de liberdade do componente REPRO.

Os graus de liberdade da REPE e da REPRO são calculados da seguinte maneira:

- REPE: $v_{REPE} = n^{\circ} \text{ de amostras} \times n^{\circ} \text{ de analistas} \times (n^{\circ} \text{ de repetições} - 1)$
- REPRO: $v_{REPRO} = n^{\circ} \text{ de amostras} \times (n^{\circ} \text{ de repetições} - 1)$

O valor da incerteza deve constar junto com os resultados finais das contagens. A incerteza pode ser expressa em percentual ou como um intervalo dentro do qual se encontra o resultado da análise com confiabilidade. É recomendado que o resultado da incerteza seja arredondado para, no máximo, dois algarismos significativos e o número de casas decimais deve ser igual

para a incerteza e para o valor numérico do resultado da medição (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). Assim, o resultado pode ser expresso de acordo com os dados utilizados nos cálculos, conforme segue.

- Expressão do resultado em logaritmo: $Z \pm X$ (%)

Sendo:

- Z: log do resultado numérico;
- X (%): incerteza em percentual (IE x 100).

- Expressão do resultado na forma numérica: [Y (Y-X até Y+X céls.mL⁻¹)]

Sendo:

- Y: resultado numérico (cél.mL⁻¹) da contagem;
- X: valor correspondente a incerteza. O valor da incerteza é calculado em log₁₀, mas na expressão do resultado final, o valor em log₁₀ deve retornar para a forma de expressão do resultado do ensaio, isto é, não de forma logarítmica.

CAPÍTULO 2: DIAGNÓSTICO DA
QUALIDADE ANALÍTICA NA
QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS

DIAGNÓSTICO DA QUALIDADE ANALÍTICA NA QUANTIFICAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS*

DIAGNOSTIC OF ANALYTICAL QUALITY IN QUANTIFICATION OF CYANOBACTERIA

Carla Cristine Müller

Mestre em Ecologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Bióloga da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN)

Maria Teresa Raya-Rodriguez

Química. Doutora em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos (UFScar). Professora associada da UFRGS

Luiz Fernando Cybis

Doutor em Engenharia Sanitária e Ambiental pela University of Leeds, United Kingdom. Professor, orientador, pesquisador e consultor do Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da UFRGS

Endereço para correspondência: Carla Cristine Müller – CORSAN / DEAL – Avenida Antônio de Carvalho, 2.667 –91430-001 – Porto Alegre (RS), Brasil – Fone: (51) 3215-5760/Fax: (51) 3215-5754 – E-mail: ccmuller@terra.com.br

RESUMO

O aumento de florações de cianobactérias em mananciais utilizados para abastecimento é uma preocupação global. Seguindo as diretrizes da Organização Mundial da Saúde, a portaria nº 518/2004, do Ministério da Saúde, determina o monitoramento de cianobactérias nos

* Artigo publicado na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, vol. 15, nº 3, Jul/Set 2010, p. 283-290.

mananciais superficiais e, quando for o caso, na água tratada. No Brasil, não há padronização de métodos de análise; assim, os métodos utilizados devem fornecer resultados confiáveis. Por meio da participação voluntária, um programa de ensaios de proficiência em cianobactérias foi realizado em 2010. Este trabalho apresenta o diagnóstico do desempenho dos laboratórios na identificação e contagem de cianobactérias. Os resultados das contagens foram submetidos ao cálculo do escore z, obtendo-se 80% de laboratórios com desempenho satisfatório. Divergências foram observadas na identificação dos gêneros de cianobactérias.

Palavras-chave: interlaboratorial; cianobactérias; qualidade analítica; análise quantitativa.

ABSTRACT

The increase of cyanobacterial blooms in water sources used for supply is a global concern. Following the guidelines of the World Health Organization, ordinance nº 518/2004, of the Ministry of Health, provides the monitoring of cyanobacteria in superficial water sources and, when appropriate, in treated water. In Brazil, there is no standardization of analysis methods; thus, the applied methods should provide reliable results. Through voluntary participation, a proficiency testing program in cyanobacteria was conducted in 2010. This paper presents the diagnostic performance of laboratories in identification and counting of cyanobacteria. Results of counts were subjected to the calculation of z-score, and 80% of laboratories presented satisfactory performance. Differences were observed in the identification of cyanobacterial genera.

Keywords: interlaboratory; cyanobacteria; analytical quality; quantitative analysis.

INTRODUÇÃO

A quantificação do fitoplâncton, em termos de células.mL⁻¹ e/ou biomassa e a sua composição taxonômica são parâmetros importantes para avaliar a qualidade da água de mananciais superficiais. A abundância e a composição da comunidade fitoplanctônica fornecem informações sobre a saúde dos ecossistemas, bem como o risco à saúde humana. Isso por que alguns organismos (especialmente cianobactérias) produzem uma ampla variedade de compostos alergênicos, tóxicos e carcinogênicos (GREGOR *et al.*, 2005). Em função disso, a qualidade das águas superficiais ao redor do mundo tem recebido atenção redobrada, pois a ausência de políticas e regulamentações para o uso da água faz com que sua degradação (antrópica, bioquímica ou por organismos vivos) inviabilize o uso a longo prazo (LEBOULANGER *et al.*, 2002).

O aumento da ocorrência de florações de cianobactérias tóxicas, associadas a eventos de contaminação da água e morte de humanos e animais, estimulou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a publicar protocolos e diretrizes de monitoramento das águas usadas para abastecimento público (CHORUS; BARTRAM, 1999). A maior preocupação são as cianobactérias, potenciais produtoras de cianotoxinas, com efeitos hepatotóxicos, neurotóxicos e dermatotóxicos aos indivíduos que ingerirem água ou alimentos contaminados.

Com base nas diretrizes da OMS, a portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004a), que estabelece o padrão de potabilidade brasileiro, determina que os mananciais superficiais utilizados para abastecimento público sejam monitorados mensalmente quanto ao número de células de cianobactérias por mL de água até 10.000 células.mL⁻¹. Acima desse limite, o monitoramento do manancial deve ser semanal. A análise da cianotoxina

microcistina passa a ser obrigatória na água tratada da saída do tratamento e nas entradas de clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis, quando o número de células de cianobactérias, no manancial, ultrapassar 20.000 células.mL⁻¹.

Considerando que a saúde e o bem-estar humano, bem como o equilíbrio ecológico, não devem ser afetados pela deterioração da qualidade das águas e que o controle da poluição está diretamente relacionado à proteção da saúde e à melhoria da qualidade de vida, foi estabelecida a legislação ambiental resolução 357 do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA), de 2005. Essa resolução, que “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” (CONAMA, 2005), também considera o número de células de cianobactérias como um parâmetro a ser avaliado.

Dessa forma, os laboratórios prestadores de serviço e os laboratórios das empresas responsáveis pelo tratamento da água devem estar capacitados para correta identificação e quantificação desses organismos. Os métodos de contagem utilizados pelos laboratórios são os descritos na bibliografia especializada, sem uma padronização em nível nacional. As metodologias clássicas de identificação e quantificação são baseadas em características morfológicas dos organismos visíveis ao microscópio ótico. Assim, os analistas devem ter habilidades e experiência na identificação dos organismos presentes nas amostras, bem como acesso à literatura específica (chaves de identificação, manuais ilustrados, entre outros) e a cursos para treinamento contínuo (KARLSON *et al.*, 2010). Ainda assim, ensinamentos e orientações de taxonomistas especialistas podem ser necessários.

A participação dos laboratórios em ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais é uma maneira de avaliar seu desempenho na execução de ensaios específicos e verificar a adequação do seu método analítico à finalidade proposta. Esses ensaios representam programas de controle de qualidade amplamente aceitos, tendo como objetivos: 1) monitorar o desempenho contínuo dos laboratórios; 2) identificar problemas em laboratórios e sinalizar a necessidade de ações corretivas; 3) identificar diferenças interlaboratoriais e 4) fornecer confiança adicional aos clientes do laboratório (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; RMRS, 2010).

Nesse contexto, foi organizado pela Rede Metrológica do Rio Grande do Sul (RMRS) um ensaio de proficiência por comparações interlaboratoriais em cianobactérias inédito em âmbito nacional. Inicialmente, foi realizada uma consulta para verificar a receptividade do programa e o número de potenciais participantes. Em função de sua ampla aceitação, o programa foi realizado em maio de 2010. Os objetivos deste trabalho foram apresentar os resultados e avaliar a situação dos laboratórios brasileiros no que diz respeito à análise de cianobactérias em amostras de água utilizadas para abastecimento público.

METODOLOGIA

A Secretaria Executiva da RMRS – com o devido apoio do Subcomitê de Microbiologia, do Comitê Temático de Meio Ambiente – organizou um programa piloto de ensaio de proficiência em cianobactérias, em maio de 2010. A RMRS é certificada pela ISO 9001 desde 1997 e, em fevereiro de 2004, teve incluído no seu escopo de certificação o processo de “provisão de programas de comparações interlaboratoriais/ensaios de proficiência”. É uma

das maiores provedoras de ensaios de proficiência da América do Sul, cadastrada no *European Proficiency Testing Information System* (EPTIS) desde novembro de 2006.

Itens de ensaio

As amostras foram preparadas a partir de água natural, proveniente de um manancial superficial utilizado para abastecimento público. Após coletada e homogeneizada, a amostra foi fracionada e envazada em frascos de polietileno, com capacidade para 1L. As amostras foram identificadas e acondicionadas em caixas térmicas com gelo, para distribuição aos laboratórios participantes. Cada participante recebeu um frasco contendo amostra preservada com solução de Lugol, preparada segundo APHA; AWWA; WEF, (2005), e um frasco contendo amostra não preservada. Foram avaliadas a identificação e a contagem total de cianobactérias. A análise foi realizada em duplicata e a quantificação, expressa em células.mL⁻¹. De acordo com os métodos normalizados para contagem de cianobactérias, tendo como referência APHA; AWWA; WEF (2005), a identificação dos organismos deve ser realizada na amostra não preservada e a contagem deve utilizar a amostra preservada.

Envio e análise dos resultados

Após o recebimento das amostras, cada laboratório definiu o momento de iniciar os ensaios. O método utilizado não foi padronizado, ou seja, cada laboratório deveria realizar as análises utilizando o seu método de rotina. Depois de encerradas as análises, cada laboratório enviou seus resultados à RMRS, com código de sigilo.

Para avaliação dos resultados enviados, utilizou-se a estatística robusta. Ao contrário da estatística clássica, a robusta sofre pouca influência de valores dispersos (*outliers*), o que dispensa a utilização de procedimentos para a identificação e remoção desses valores.

O desempenho de cada laboratório participante deste ensaio de proficiência foi avaliado a partir da análise estatística dos resultados enviados, sendo definida a estimativa do valor real (valor designado) por meio de consenso, seguindo-se as diretrizes da norma ISO/DIS 13528 (ISO,2005) Para avaliação desse desempenho, foi utilizado o escore z, seguindo-se as orientações da NBR ISO/IEC Guia 43-1:1999 (ABNT, 2005c) e do ILAC-G13:08 (ILAC, 2007). Cada laboratório foi avaliado com relação à média da duplicata de seus resultados, sendo informado, também, o coeficiente de variação (CV) do grupo de laboratórios participantes.

O escore z da média das duplicatas de cada laboratório, calculado utilizando-se como referência o documento ISO (2005), classifica o desempenho dos laboratórios como “satisfatório”, “questionável” ou “insatisfatório”, conforme o valor do escore Z:

Se: $|Z| \leq 2$, resultado satisfatório
 $2 < |Z| < 3$, resultado questionável
 $|Z| \geq 3$, resultado insatisfatório

Os resultados também foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) para verificar a equivalência entre os métodos de contagem utilizados pelos laboratórios.

Testes de homogeneidade e estabilidade

Uma análise estatística, com relação à homogeneidade e à estabilidade das amostras preservadas do programa, foi realizada visando verificar se a variabilidade proveniente da eventual falta de homogeneidade ou estabilidade não foi significativa perante a variabilidade total dos ensaios. Os testes de homogeneidade e estabilidade foram realizados conforme a norma ISO/DIS 13528 (ISO, 2005).

Para o teste de homogeneidade, foram analisadas dez amostras, em duplicata, imediatamente após a preparação e distribuição das amostras aos participantes. Para avaliação da homogeneidade, a referida norma adota um critério para garantir que o desvio padrão entre as amostras contribua com não mais do que 30% para o desvio padrão do ensaio de proficiência.

Para o teste da estabilidade, foram selecionadas, aleatoriamente, três amostras do teste de homogeneidade que foram analisadas, em duplicata, uma semana após a preparação e distribuição das amostras aos participantes (ISO, 2005).

RESULTADOS

O programa piloto ocorreu por meio de uma rodada de análises. Participaram desse programa 30 laboratórios de todo o país, entre eles, laboratórios de empresas de saneamento, prestadores de serviços e da área da saúde.

Os resultados do teste de homogeneidade na preparação das amostras são apresentados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Resultados do teste de homogeneidade na preparação das amostras.

Amostra	Total de cianobactérias (cél.s.mL ⁻¹)		Total de cianobactérias (Logaritmo)	
	Média	Amplitude	Média	Amplitude
1	14.254	5.404	4,15	0,17
2	10.633	2.597	4,02	0,11
3	13.417	4.275	4,12	0,14
4	14.969	295	4,18	0,01
5	13.796	3.513	4,14	0,11
6	14.841	2.470	4,17	0,07
7	16.570	2.465	4,22	0,06
8	13.705	1.536	4,14	0,05
9	15.337	3.429	4,18	0,10
10	13.715	479	4,14	0,02

Fonte: RMRS, 2010

Para as amostras serem consideradas homogêneas, o critério de aceitação, segundo a norma ISO/DIS 13528 (ISO, 2005) é que o desvio entre as amostras do teste de homogeneidade ($s_s = 311$ / em logaritmo: $s_s = 0,02$) deve ser menor do que 0,3 vezes o desvio do grupo de laboratórios participantes ($0,3 \times \text{desvio robusto} = 0,3 \times 10.705 = 3.212$ / em logaritmo: $0,3 \times \text{desvio robusto} = 0,3 \times 0,23 = 0,07$). Portanto, as amostras foram consideradas homogêneas.

A Tabela 2.2 apresenta os dados do teste de estabilidade na preparação das amostras.

Tabela 2.2. Resultados do teste de estabilidade na preparação das amostras.

Amostra	Total de cianobactérias (cél.s.mL ⁻¹)		Total de cianobactérias (Logaritmo)	
	Média	Amplitude	Média	Amplitude
7	14.503	2.323	4,16	0,06
8	15.046	301	4,18	0,01
9	14.993	3.571	4,17	0,10

Fonte: RMRS, 2010

Para as amostras serem consideradas estáveis, o critério de aceitação, segundo a norma ISO/DIS 13528 (ISO, 2005), é que o módulo da diferença ($|x-y| = 723$ / em logaritmo: $|x-y| = 0,03$) da média obtida no teste de homogeneidade ($x = 14.123$ / em logaritmo: $x = 4,14$) e da média obtida no teste de estabilidade ($y = 14.847$ / em logaritmo: $y = 4,17$) deve ser menor ou igual do que 0,3 vezes o desvio do grupo de laboratórios participantes ($0,3 \times \text{desvio robusto} = 0,3 \times 10.705 = 3.212$ / em logaritmo: $0,3 \times \text{desvio robusto} = 0,3 \times 0,23 = 0,07$). Portanto, as amostras foram consideradas estáveis.

As metodologias utilizadas pelos participantes correspondem a métodos microscópicos para quantificação do fitoplâncton. Dezesesseis laboratórios utilizaram o método de Sedgwick-Rafter e 14 utilizaram o método de Utermöhl (RMRS, 2010) (Tabela 2.3).

A Tabela 2.3 apresenta também os resultados das contagens, em duplicata, de cada participante e o escore z de cada um. Os dados também foram analisados após transformação para logaritmo base 10, pois como são dados de contagem, são mais bem avaliados após transformação, já que estabiliza a variação entre os resultados (ISO, 2006b) Na Tabela 2.4, são apresentados os parâmetros estatísticos.

Dos 30 laboratórios participantes, 24 apresentaram desempenho satisfatório, 1 apresentou desempenho questionável e 5 apresentaram desempenho insatisfatório.

A ANOVA mostrou equivalência entre os métodos de contagem de Sedgwick-Rafter e de Utermöhl ($F = 0,027$; $p = 0,97$) (Tabela 2.4).

Tabela 2.3. Resultados da Rodada Piloto para contagem total de cianobactérias.

Laboratório	1ª via (cél.s.mL ⁻¹)	2ª via (cél.s.mL ⁻¹)	1ª via (Logaritmo)	2ª via (Logaritmo)	Z Escore (Logaritmo)	Método de contagem
1	7.431	7.673	3,87	3,88	-1,65	Utermöhl
2	17.364	19.584	4,24	4,29	0,01	Sedgwick-Rafter
3	35.531	38.819	4,55	4,59	1,31	Utermöhl
4 **	2.633	2.728	3,42	3,44	-3,58	Utermöhl
5	37.603	43.967	4,58	4,64	1,48	Utermöhl
6	27.678	19.012	4,44	4,28	0,45	Sedgwick-Rafter
7	28.785	30.785	4,46	4,49	0,90	Utermöhl
8	8.599	31.597	3,93	4,50	0,17	Utermöhl
9	25.932	24.883	4,41	4,40	0,60	Utermöhl
10 **	1.484	1.370	3,17	3,14	-4,75	Sedgwick-Rafter
11 **	2.430	2.315	3,39	3,36	-3,80	Sedgwick-Rafter
12 **	1.052.790	957.315	6,02	5,98	7,43	Sedgwick-Rafter
13	21.668	22.233	4,34	4,35	0,33	Sedgwick-Rafter
14	17.091	13.917	4,23	4,14	-0,32	Utermöhl
15	31.689	30.653	4,50	4,49	0,98	Utermöhl
16	30.811	30.151	4,49	4,48	0,94	Sedgwick-Rafter
17	19.371	19.453	4,29	4,29	0,10	Sedgwick-Rafter
18	21.419	22.664	4,33	4,36	0,34	Sedgwick-Rafter
19	17.359	20.513	4,24	4,31	0,06	Sedgwick-Rafter
20	22.324	19.336	4,35	4,29	0,23	Sedgwick-Rafter
21	5.693	17.043	3,76	4,23	-0,89	Utermöhl
22	24.077	26.695	4,38	4,43	0,60	Sedgwick-Rafter
23 *	6.025	4.425	3,78	3,65	-2,34	Sedgwick-Rafter
24 **	3.738	3.052	3,57	3,48	-3,14	Sedgwick-Rafter
25	10.595	9.418	4,03	3,97	-1,13	Utermöhl
26	13.500	11.010	4,13	4,04	-0,75	Sedgwick-Rafter
27	17.128	14.769	4,23	4,17	-0,26	Utermöhl
28	15.951	16.455	4,20	4,22	-0,23	Sedgwick-Rafter
29	23.978	25.229	4,38	4,40	0,54	Utermöhl
30	27.388	19.251	4,44	4,28	0,44	Utermöhl

*Laboratório com desempenho questionável – **Laboratório com desempenho insatisfatório

Fonte: RMRS, 2010

Tabela 2.4. Avaliação Estatística dos Resultados enviados pelos Laboratórios participantes.

	Total de cianobactérias (cél.s.mL ⁻¹)	Total de cianobactérias (Logaritmo)
TOTAL DE LABORATÓRIOS PARTICIPANTES (30)		
Média Robusta	19.099	4,26
Desvio Robusto	10.705	0,23
Nº total de laboratórios	30	30
Coefficiente de Variação	56%	5,48%
LABORATÓRIOS QUE UTILIZARAM MÉTODO DE UTERMÖHL		
Média Robusta	21.101	4,29
Desvio Robusto	12.806	0,25
Nº total de laboratórios	14	14
Coefficiente de Variação	61%	5,74%
LABORATÓRIOS QUE UTILIZARAM MÉTODO DE SEDGWICK-RAFTER		
Média Robusta	18.159	4,26
Desvio Robusto	8.833	0,18
Nº total de laboratórios	16	16
Coefficiente de Variação	49%	4,18%

Fonte: RMRS, 2010

Em relação à análise qualitativa, verificou-se maior divergência entre os participantes (Tabela 2.5), sendo que somente um laboratório não identificou o organismo predominante (*Planktothrix* sp.).

Muitos laboratórios informaram que não puderam identificar os gêneros da família Nostocaceae devido à ausência de estruturas (acinetos e heterocitos) que permitem a sua diferenciação. Assim, na Tabela 2.5, Nostocaceae inclui os gêneros *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Cuspidothrix* e *Raphidiopsis*, identificados pelos participantes.

DISCUSSÃO

Comparações interlaboratoriais como esta, realizada por meio do programa piloto de ensaios de proficiência em cianobactérias, não são comuns para fitoplâncton, nem para o grupo das cianobactérias. A quantificação desses organismos é uma exigência da portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde brasileiro (BRASIL, 2004a) e da Resolução CONAMA 357/2005 (CONAMA, 2005); por isso, há importância em avaliar o desempenho dos laboratórios que realizam esse ensaio no país.

Estudos de comparação interlaboratorial já foram realizados por Gohde *et al.* (2007) e Vuorio, Lepistö e Holopainen (2007), porém, com formatos diferenciados. O primeiro fez a comparação entre métodos clássicos e métodos moleculares para uma única espécie de dinoflagelado marinho. O segundo avaliou organismos específicos, informados no início do estudo, e empregou método e orientações de contagem iguais para todos os participantes. A proposta do programa promovido pela RMRS foi diferente, seguindo-se a norma ISO/DIS

Tabela 2.5. Gêneros de cianobactérias identificados pelos laboratórios participantes.

Gêneros identificados	Nº de laboratórios que identificaram o gênero
<i>Anabaena</i>	2
<i>Aphanocapsa</i>	6
<i>Calothrix</i>	1
<i>Chroococcus</i>	4
<i>Coelomorum</i>	1
<i>Coelosphaerium</i>	1
<i>Geitlerinema</i>	11
<i>Jaaginema</i>	1
<i>Limnothrix</i>	5
<i>Merismopedia</i>	20
<i>Microcystis</i>	12
<i>Myxobaktron</i>	1
<i>Oscillatoria</i>	5
<i>Phormidium</i>	3
<i>Planktolyngbya</i>	5
<i>Planktothix</i>	29
<i>Pseudanabaena</i>	13
<i>Rhabdoderma</i>	1
<i>Romeria</i>	2
<i>Snowella</i>	1
<i>Sphaerocavum</i>	2
<i>Spirulina</i>	1
<i>Synechococcus</i>	3
<i>Synechocystis</i>	2
<i>Tychonema</i>	1
<i>Wolskyella</i>	1
<i>Nostocaceae*</i>	26
<i>Não identificado</i>	2

* Inclui gêneros pertencentes à família que não puderam ser diferenciados.

13528 (ISO, 2005) nessa proposta, os laboratórios recebiam a mesma amostra, mas o preparo, método e critérios de contagem seguiam a rotina de análise de cada participante.

Os testes de homogeneidade e estabilidade, indicando que as amostras foram homogêneas e estáveis nas condições consideradas, mostram que, mesmo os organismos distribuindo-se de

forma agregada e formando suspensão com variabilidade inerente (ISO, 2006a) é possível reproduzir os resultados em amostras fracionadas. Com a agitação da amostra, que deve ocorrer de forma suave para não romper os arranjos coloniais, atinge-se a homogeneidade. Em relação à estabilidade, confirma-se a eficácia da solução de Lugol quando as amostras são refrigeradas e mantidas no escuro (EDLER; ELBRÄCHTER, 2010).

Os resultados quantitativos, apresentados pela maioria dos laboratórios participantes do programa, indicam que os métodos de contagem utilizados são adequados para a quantificação das cianobactérias. O método de Utermöhl é recomendado para a quantificação de cianobactérias (CHORUS; BARTRAM, 1999; CETESB, 2005; CEN, 2006; EPA, 2007) e caracteriza-se por ser um método que demanda mais tempo para a realização da análise (em função do longo tempo para sedimentação das câmaras de contagem) e um custo com equipamento mais elevado (necessidade de microscópio específico, isto é, microscópio invertido) (EDLER; ELBRÄCHTER, 2010). Os resultados mostram que o método de Sedgwick-Rafter (BRANCO, 1986; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005; LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010) também pode ser utilizado para a contagem desses organismos. Esse método permite maior rapidez na obtenção do resultado e não requer equipamento específico. A utilização de microscópio ótico comum o torna um método de custo mais baixo (EDLER; ELBRÄCHTER, 2010; LEGRESLEY; MC DERMOTT, 2010). Entretanto, cabe ressaltar que o resultado pode ser sub ou superestimado, em função dos fatores de correção que devem ser utilizados para obtenção do resultado final (GOHDE *et al.*, 2007); por isso, deve-se ter muito cuidado, para um correto preparo da amostra (concentração ou diluição, quando for o caso). Dentre os laboratórios que apresentaram desempenho insatisfatório, 80% utilizaram esse método de contagem.

Comparando-se com programas de proficiência envolvendo ensaios microbiológicos da RMRS, o CV obtido neste programa piloto é mais baixo (56%). Quanto maior o CV, maior o número de laboratórios na categoria de desempenho aceitável, pois a faixa de aceitabilidade fica aumentada (RMRS, 2010). Nos ensaios microbiológicos, são comuns CVs maiores do que 100%. Dessa forma, todos os laboratórios devem avaliar criticamente seu procedimento de análise a fim de reduzir o CV em rodadas futuras, aumentando a precisão dos resultados (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2010).

Embora não seja o método mais recomendado pela literatura especializada para a quantificação de cianobactérias, os resultados mostraram que o método de Sedgwick-Rafter é adequado a essa finalidade, fornecendo resultados satisfatórios e semelhantes aos resultados obtidos pelo método de Utermöhl. Além disso, foi o método com menor variabilidade, isto é, apresentou um CV de 49%, menor do que o método de Utermöhl (CV = 61%) e do que os dois métodos em conjunto (CV = 56%) (Tabela 2.4). Isso indica uma menor faixa de variação entre os resultados dos laboratórios que realizaram a análise por meio desse método.

Em relação à análise qualitativa (Tabela 2.5), poucos gêneros foram encontrados pela maioria dos laboratórios. Em contrapartida, muitos gêneros foram encontrados por somente um participante. Dentre os gêneros apresentados, muitos podem ter identificação dificultada. *Calothrix*, *Myxobaktron*, *Spirulina*, *Synechocystis* e *Synechococcus* têm ocorrência rara ou poucas espécies já foram mencionadas no Brasil (WERNER, 2002; BICUDO; MENEZES, 2006). Os três primeiros gêneros ainda podem ser confundidos com o gênero *Cylindrospermopsis*, que apresenta grande variação morfológica (KOMÁREK; KLING, 1991).

Os gêneros *Jaaginema* e *Romeria* são morfologicamente semelhantes à *Geitlerinema*, assim como *Tychonema* pode ser confundido com *Oscillatoria*, *Sphaerocavum* com *Microcystis* e *Rhabdoderma* com *Aphanocapsa* e *Aphanotece*. Ainda há organismos com filamentos finos ou mesmo células isoladas, como *Limnothrix* e *Planktolyngbya* ou *Synechococcus*, respectivamente, que, quando observados em pequenos aumentos, podem ser confundidos com bactérias heterotróficas. O uso de microscópio com epifluorescência auxilia nessa diferenciação, pois a clorofila presente nos organismos autotróficos apresenta autofluorescência (GREGOR; MARŠÁLEK, 2004; MACEDO; MARINO, 2007; KARLSON *et al.*, 2010). Organismos pertencentes ao picoplâncton, como algumas espécies dos gêneros *Snowella*, *Coelomorum* e *Coelosphaerium* (KOMÁREK; ANAGNOSTIDIS, 1998), que apresentam arranjo colonial semelhante entre si, podem ter identificação imprecisa. Isso pode ocorrer devido aos métodos utilizados pelos participantes que não são recomendados para identificação e quantificação de organismos dessa categoria (VUORIO; LEPISTÖ; HOLOPAINEN, 2007; LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010).

As divergências na identificação, o registro de organismos não identificados e a dificuldade para a diferenciação dos gêneros da família Nostocaceae podem indicar falta de conhecimento ou de treinamento adequado dos analistas. Enquanto a legislação exigir a quantificação do grupo das cianobactérias, os resultados apresentados pelos laboratórios são coerentes. Porém, uma identificação correta dos gêneros presentes também é importante. De acordo com os gêneros encontrados, é possível avaliar a potencialidade da produção de cianotoxinas e realizar a análise apropriada, se necessário (CHORUS; BARTRAM, 1999; SANT'ANNA *et al.*, 2006; CYBIS *et al.*, 2006).

CONCLUSÕES

O programa piloto de ensaios de proficiência em cianobactérias pode ser considerado uma primeira avaliação de desempenho de alguns laboratórios brasileiros responsáveis pela análise de cianobactérias em mananciais superficiais. Assim como os demais programas dessa natureza, seus objetivos foram atingidos (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; RMRS, 2010). Os métodos analíticos utilizados pelos laboratórios, a saber, método de Sedgwick-Rafter e método de Utermöhl, mostraram-se adequados e equivalentes para a quantificação de cianobactérias, não havendo necessidade de uma padronização de método de ensaio. De maneira geral, os laboratórios estão desempenhando bem a tarefa de quantificar esses organismos. Com base nos resultados obtidos, que servem como uma ferramenta de melhoria contínua, os laboratórios devem avaliar a identificação das cianobactérias e, se pertinente, propor internamente ações corretivas, preventivas e/ou oportunidades de melhoria. Os laboratórios com desempenho questionável e insatisfatório na análise quantitativa também devem realizar análise crítica em relação ao seu método de contagem, sempre buscando melhoria contínua na confiabilidade analítica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Rede Metrológica do Rio Grande do Sul, pela provisão do programa piloto de ensaios de proficiência em cianobactérias e autorização para divulgação dos dados do seu programa, e ao Laboratório Central de Águas da Companhia Riograndense de Saneamento, em especial, Andréa dos Anjos, Aurea Giordani e Juliana Frizzo, pelo fornecimento e preparação das amostras, utilização de suas instalações e apoio na realização das análises.

REFERÊNCIAS

ALBANO, F.M.; RAYA-RODRIGUEZ, M.T. *Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: guia prático*. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION APHA AWWA WEF (APHA; AWWA; WEF). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington, D.C., 2005.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). *ASTM D4148-82: Standard test method for analysis of phytoplankton in surface water by the Sedgwick-Rafter method*. West Conshohocken, PA, USA: ASTM, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR ISO/IEC Guia 43-1:1999: ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais - Parte 1: desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005c.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. (Orgs.). *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BRANCO, S.M. *Hidrobiologia aplicada à Engenharia Sanitária*. 3 ed.. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Portaria nº 518, de 25 de março de 2004: estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências*. Brasília: Diário Oficial da União, n. 59, p. 266-270, 2004a.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. *Mikrochimica Acta*. v. 128, n. 1-2, p. 93-106, 1998.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: Spon E & EN, 1999.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). *Norma Técnica L5.303: fitoplâncton de água doce - métodos qualitativo e quantitativo (método de ensaio)*. São Paulo, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). *Resolução CONAMA nº 357. 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*. Brasília: Diário Oficial da União, n. 53, p. 58-63, 2005.

CYBIS, L.F. *et al.* *Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: caso da represa Lomba do Sabão e Lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul*. Rio de Janeiro: ABES, 2006.

EDLER, L.; ELBRÄCHTER, M. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Eds.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 2010, p. 13-20.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *LG401: Standard Operating Procedure for Phytoplankton Analysis*. Revision 4. Washington, DC, 2007.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (CEN). *EN 15204: Water Quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)*. Brussels: CEN, 2006.

GOHDE, A. *et al.* Intercalibration of classical and molecular techniques for identification of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) and estimation of cell densities. *Harmful Algae*, v. 6, p. 56-72, 2007.

GREGOR, J. *et al.* *In situ* quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia*, v. 548, n. 1, p. 141-151, 2005.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research*, v. 38, n. 3, p. 517-522, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). 2010. *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos*. DOQ-CGCRE-008: Revisão 03. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2010.

INTERNATIONAL LABORATORY ACCREDITATION COOPERATION (ILAC). *ILAC-G13:08 - Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes*. ILAC: Austrália, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*. Geneva: ISO, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *ISO 19458. Water quality – Sampling for microbiological analysis*. Geneva: ISO, 2006a.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *ISO/TS 19036. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines of the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. Geneva: ISO, 2006b.

KARLSON, B. *et al.* Introduction to methods for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Eds.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 2010, p. 5-12.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. In: PASCHER, A. (Ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1998, p. 192-224.

KOMÁREK, J.; KLING, H. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). *Algological Studies*, v. 61, p. 21-45, 1991.

LEBOULANGER, C. *et al.* Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 30, p. 83-89, 2002.

LEGRESLEY, M.; MCDERMOTT, G. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis – haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Eds.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris: United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization, 2010, p. 25-30.

MACEDO, A.; MARINO, L. *O microscópio de epifluorescência como auxiliar na identificação de cianobactérias*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24, Anais... Belo Horizonte: ABES, I-176, 2007.

REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). *Programa Piloto de Ensaio de Proficiência em Cianobactérias*: relatório de 2010. Porto Alegre: RMRS, 2010.

SANT'ANNA, C.L. *et al. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras*. Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006.

VUORIO, K.; LEPISTÖ, L.; HOLOPAINEN, A.L. Intercalibrations of freshwater phytoplankton analyses. *Boreal Environment Research*, v. 12, n. 5, p. 561-570, 2007.

WERNER, V.R. *Cyanophyceae/Cyanobacteria no sistema de lagoas e lagunas da Planície Costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, SP, 2002.

CAPÍTULO 3: VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE SEDGWICK-RAFTER PARA A QUANTIFICAÇÃO DO FITOPLÂNCTON

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE SEDGWICK-RAFTER PARA A QUANTIFICAÇÃO DO FITOPLÂNCTON*

SEDGWICK-RAFTER METHOD VALIDATION FOR QUANTIFICATION OF PHYTOPLANKTON

Carla Cristine Müller

Mestre em Ecologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Bióloga da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN).

Luiz Fernando Cybis

Doutor em Engenharia Sanitária e Ambiental pela The University of Leeds, Inglaterra.
Professor, orientador, pesquisador e consultor do Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Maria Teresa Raya-Rodriguez

Doutora em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos.
Química e professora associada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Endereço para correspondência: Companhia Riograndense de Saneamento – Departamento de
Ensaio e Apoio Laboratorial – Av. Antônio de Carvalho, 2667 – CEP: 91430-001 – Porto
Alegre – RS – Tel: (51) 3215-5760 – email: ccmuller@terra.com.br

RESUMO

A degradação dos ambientes aquáticos altera a comunidade biótica. O fitoplâncton responde rapidamente a essas alterações. Por exemplo, as cianobactérias predominam em ambientes eutrofizados. Quando o manancial é utilizado para abastecimento público, gera dificuldades no tratamento da água na remoção de sabor, odor e cianotoxinas. Monitoramentos para avaliar e quantificar a comunidade fitoplanctônica devem utilizar métodos confiáveis. Um dos

* Manuscrito aceito para publicação na Revista DAE.

métodos normalizados é o de Sedgwick-Rafter utilizando amostras preservadas. O objetivo deste trabalho foi validar o método de Sedgwick-Rafter com amostras não preservadas. Realizou-se um estudo de validação envolvendo estabilidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e quantificação do método, Z-score e incerteza de medição. O método foi validado e considerado adequado à finalidade proposta na rotina laboratorial.

Palavras-chave: validação; fitoplâncton; qualidade analítica; método de Sedgwick-Rafter

ABSTRACT

The degradation of aquatic environments alters biotic community. Phytoplankton respond quickly to these changes. For example, cyanobacteria dominates in eutrophic environments. When a water source is used for public supply, creates difficulties in water treatment in removing taste, odor and cyanotoxins. Monitoring to assess and quantify the phytoplankton community should use reliable methods. One of the standard methods is the Sedgwick-Rafter using preserved samples. The aim of this study was to validate the Sedgwick-Rafter method with unpreserved samples. A validation study was conducted involving stability, accuracy, precision, robustness, limits of detection and quantification of the method, Z-score and measurement uncertainty. The method was validated and deemed appropriate for the proposed purpose for routine monitoring.

Keywords: validation; phytoplankton; analytical quality; Sedgwick-Rafter method

INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, nos ecossistemas aquáticos, tem como consequência o aumento de sua produtividade e caracteriza-se como processo de eutrofização (ESTEVES, 1998). Dentre as mudanças nas comunidades aquáticas, uma rápida resposta à eutrofização é dada pela comunidade fitoplanctônica que passa a apresentar uma redução na diversidade de espécies, porém, com aumento considerável da biomassa das espécies presentes. Nesses ambientes, tem sido observado um aumento da dominância de espécies de cianobactérias, principalmente próximo aos centros urbanos. A ocorrência de florações nos ambientes eutrofizados é uma das características mais evidentes desse processo e ocorrem com maior frequência nos meses mais quentes do ano (ESTEVES, 1998; XAVIER, *et al*, 2005).

Em função da eutrofização, muitos lagos em todo o mundo já se encontram seriamente afetados. Reservatórios e rios também estão ameaçados. Esses ambientes perdem sua qualidade cênica, seu potencial recreacional e, de forma geral, seu valor econômico, tanto para o uso no abastecimento público, quanto para o uso industrial (XAVIER, *et al*, 2005).

O monitoramento dos grupos fitoplanctônicos é importante para garantir a qualidade da água para abastecimento público. A eutrofização interfere na qualidade da água, provocando consequências sanitárias. Dentre elas podemos destacar a obstrução de filtros em estações de tratamento de água (ETAs), aumento dos custos com produtos químicos para o tratamento da água, coloração, sabor e odor desagradáveis nas águas de abastecimento, variação frequente de pH e incorporação de novas etapas à seqüência de tratamento. No entanto, o principal problema sanitário e que acarreta dificuldades no tratamento é a toxicidade de certas espécies

de cianobactérias capazes de liberar compostos potencialmente tóxicos na água (BRANCO, 1986; DI BERNARDO, 1995; CARNEIRO; PEGORINI; ANDREOLI, 2005).

A análise do fitoplâncton pode ser realizada por diversos métodos descritos na literatura. Para a quantificação do fitoplâncton há métodos microscópicos (BRANCO, 1986; LAWTON *et al.*, 1999; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005; CEN, 2006; EPA, 2007; LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010; EDLER; ELBRÄCHTER, 2010) e métodos moleculares (GALLUZZI; PENNA, 2010; GESCHER; METFIES; MEDLIN, 2010; MARRIN III; SCHOLIN, 2010; DIERCKS; METFIES; MEDLIN, 2010). Além destes, há métodos que utilizam fluorescência (BEUTLER *et al.*, 2002; LÉBOULANGER *et al.*, 2002; GREGOR; MARŠÁLEK, 2004; GREGOR *et al.*, 2005) e contagem de partículas (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998; DUBELAAR *et al.*, 1999; DUBELAAR; GERRITZEN, 2000; OLSON; SHALAPYONOK; SOSIK, 2003; SOSIK *et al.*, 2003; SOSIK; OLSON, 2007; THYSSEN *et al.*, 2008).

Os métodos através de microscopia óptica são os mais utilizados, destacando-se o método de Sedgwick-Rafter (S-R) e o de Utermöhl. O método de S-R utiliza câmaras de contagem que recebem o mesmo nome, com capacidade para 1 mL, amostras preservadas, concentradas por filtração, sedimentação ou centrifugação e microscópio comum (APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005). É um método de baixo custo, pois não há necessidade de microscópio específico e fornece os resultados em curto período de tempo, quando comparado com o método de Utermöhl (EDLER; ELBRÄCHTER, 2010). Isso é possível, uma vez que o tempo de sedimentação das câmaras de contagem é de 15 minutos e a concentração pode ser realizada em 20 minutos por centrifugação (APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005).

Para garantir eficiente monitoramento do fitoplâncton, principalmente, em mananciais utilizados para abastecimento público, os métodos de contagem devem fornecer resultados precisos, exatos e confiáveis. De acordo com a NBR ISO/IEC 17025, “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” (ABNT, 2005a), os laboratórios que pretendem ser reconhecidos como capacitados tecnicamente para realizar ensaios específicos, devem garantir a confiabilidade analítica dos ensaios realizados.

O resultado de uma medição é, em geral, uma estimativa do valor do objeto de medição. Desta forma, a apresentação do resultado é completa somente quando acompanhada por uma quantidade que declara sua incerteza, ou seja, a dúvida ainda existente no processo de medição. Do ponto de vista técnico, quando realiza-se uma medição, espera-se que ela tenha exatidão (mais próxima do valor verdadeiro) e que apresente características de repetitividade (concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas sob as mesmas condições) e reprodutibilidade (concordância entre os resultados das medições efetuadas sob condições variadas) (RMRS, 2003).

Nesse contexto, os ensaios realizados devem ser executados de acordo com métodos normalizados, publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais, por organizações técnicas respeitáveis, em textos ou jornais científicos relevantes. Podem também ser usados métodos desenvolvidos ou adotados pelo laboratório de análise, se forem apropriados para o uso e se estiverem validados. Uma vez escolhido o método de ensaio, o laboratório deverá validar seu método, se este for realizado através de método normalizado utilizado fora do escopo para o qual foi concebido ou ampliações e modificações de métodos normalizados (ABNT, 2005a).

O processo de validação é a garantia experimental de que o método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). De acordo com Bruce, Minkkinen e Riekkola (1998), esse processo pode ser realizado através de checagens básicas ou testes trabalhosos, dependendo do propósito do método a ser validado e do nível de qualidade associado.

Assim, os passos necessários para a Validação de Métodos Laboratoriais incluem o estudo dos seguintes parâmetros, quando aplicáveis, requeridos como evidência objetiva da validação do método analítico: especificidade e seletividade, estabilidade, sensibilidade, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, incerteza de medição e robustez (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2010).

Para a validação do método de contagem do fitoplâncton são aplicáveis os estudos dos parâmetros descritos a seguir, de acordo com Bruce, Minkkinen e Reikkola (1998), INMETRO (2010) e Albano e Raya-Rodriguez (2009):

- a) Estabilidade: variação do analito ao longo do tempo como resposta às condições de armazenamento, manuseio e análise;
- b) Exatidão: grau de concordância entre resultado e valor aceito como verdadeiro;
- c) Precisão: concordância entre vários valores experimentais obtidos. Expressa por desvio padrão, coeficiente de variação ou repetitividade (REPE) (condições iguais) e reprodutibilidade (REPRO) (condições variadas);
- d) Robustez: suscetibilidade do método em responder a pequenas alterações das condições experimentais;

- e) Z-score (abordagem interlaboratorial): amplamente utilizado em Ensaio de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais com o objetivo de avaliar o desempenho dos laboratórios participantes como satisfatório, questionável e insatisfatório;
- f) Limite de detecção do método (LDM) e limite de quantificação do método (LQM):
LDM é a concentração mínima, maior do que zero, com 95 a 99% de confiança e
LQM é a menor concentração determinada com exatidão e precisão aceitáveis;
- g) Incerteza de medição: dispersão dos valores atribuídos a um mensurado, considerando todos os fatores significativos de influência no ensaio.

Com o objetivo de validar o método de Sedgwick-Rafter para quantificação do fitoplâncton, utilizando amostras não preservadas, foi realizado um estudo de validação, conforme resultados apresentados neste trabalho. A utilização de amostras vivas favorece a correta identificação dos organismos (CETESB, 2005), não gera resíduos laboratoriais pelo uso de preservantes e representa economia de tempo e de custo de análise.

MATERIAIS E MÉTODOS

Conforme preconiza a NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a), a validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Há necessidade de validação do ensaio de fitoplâncton, pois o método normalizado de referência (APHA; AWWA; WEF, 2005) é utilizado com modificação. Neste, as amostras devem ser preservadas com, por exemplo,

solução de Lugol. No entanto, o método a ser validado utiliza amostras sem preservante algum. Os parâmetros estudados para a validação do método estão descritos abaixo.

- Estabilidade

O estudo da estabilidade seguiu as orientações de Albano e Raya-Rodriguez (2009).

A avaliação do tipo de preservação foi realizada através da comparação entre 10 conjuntos de amostras, cada um composto por amostra preservada com Lugol (APHA; AWWA; WEF, 2005) e amostra viva (isto é, sem nenhuma preservação), analisadas em duplicata, ao longo do tempo de armazenamento (imediatamente após a coleta e 1, 2, 3, 4 e 7 dias após a coleta) sob refrigeração.

O tipo de armazenamento foi avaliado comparando 10 conjuntos de amostras, cada um composto por amostra viva mantida sem refrigeração durante 3 dias antes da análise e amostra viva armazenada sob refrigeração até a análise. As amostras foram analisadas, em duplicata, nos seguintes tempos: 3, 4 e 7 dias após a coleta.

Os dados foram transformados em \log_{10} e analisados estatisticamente através de análise de variância, utilizando o software Microsoft Excel, com nível de significância de 95%.

- Exatidão

A comparação entre o método que se quer validar e o método normalizado foi realizada com a colaboração da Divisão de Pesquisa do Departamento Municipal de Água e Esgoto do município de Porto Alegre (DVP-DMAE). O Laboratório de Hidrobiologia da DVP-DMAE utiliza o método de Sedgwick-Rafter de acordo com APHA, AWWA e WEF (2005).

A mesma amostra foi analisada pelos dois laboratórios, sendo realizadas 7 replicatas por cada um. Os resultados foram transformados em \log_{10} e analisados pelo Teste- t para variâncias equivalentes com 95% de confiança, através do software Microsoft Excel (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

- Precisão

O estudo da precisão do método foi baseado na Repetitividade (REPE) e na Reprodutibilidade (REPRO), realizado seguindo o Estudo Formal de Repetitividade e Reprodutibilidade proposto por Albano e Raya-Rodriguez (2009).

Foram avaliados dois analistas, realizando a contagem de 20 amostras, em triplicata e em curto intervalo de tempo entre elas. Os dados foram transformados em \log_{10} e analisados estatisticamente, obtendo-se o desvio da REPE (σ_{REPE}), o desvio da REPRO (σ_{REPRO}) e o desvio de REPE e REPRO (R&R(%)). Para detalhes dos cálculos, consultar Albano e Raya-Rodriguez (2009).

- Robustez

Para o estudo da robustez foram avaliados três fatores que poderiam causar pequenas interferências no método, sendo frasco de coleta (polietileno não coberto por papel alumínio e polietileno coberto por papel alumínio), microscópio (equipamento 1 – Olympus BX50 – e equipamento 2 – Olympus BX51) e tempo até a análise (imediatamente após a coleta e 3 dias após a coleta).

Segundo a metodologia de Albano e Raya-Rodriguez (2009), foram analisadas 6 replicatas de cada uma das combinações entre os três fatores, totalizando 8 combinações. Para cada fator foi calculada uma diferença entre as combinações. A média das diferenças elevadas ao quadrado (M) foi utilizada para o cálculo do desvio da robustez (σ_{ROB}) (Equação 3.1).

$$\sigma_{\text{ROB}} = \sqrt{2 \times M} \quad (\text{Equação 3.1})$$

O método é considerado robusto se σ_{ROB} for menor do que o desvio da REPRO (σ_{REPRO}).

- Z-score (abordagem interlaboratorial)

O método de contagem do fitoplâncton em processo de validação foi utilizado na participação do Programa Piloto de Ensaio de Proficiência em Cianobactérias promovido pela Rede Metrológica do Rio Grande do Sul (RMRS), ocorrido em maio de 2010 (MÜLLER; RAYA-RODRIGUEZ; CYBIS, 2010).

O Programa consistiu na identificação e contagem de cianobactérias. Foram recebidas amostra viva (1L) e amostra preservada com solução de Lugol (1L). Os métodos de contagem recomendam que seja utilizada amostra preservada para a quantificação, o que também foi recomendado pela RMRS. No entanto, com o objetivo de validar o método, a quantificação foi realizada com a amostra viva. Os resultados foram enviados à RMRS para cálculo do desempenho dos laboratórios participantes (Z-score). Quanto mais próximo de zero for o Z-score, mais próximo do valor alvo estará a resposta analítica do laboratório.

- Limite de Detecção do Método (LDM)

Baseado no LDM teórico de 3 céls./mL, de acordo com a distribuição de Poisson (ISO/TR, 2001), foi selecionada uma amostra com baixa densidade celular, porém, acima no limite referido, para realização do cálculo do LDM. O LDM foi calculado seguindo Albano e Raya-Rodriguez (2009).

Foram analisadas 7 replicatas da amostra selecionada e calculada a média (\bar{x}) e o desvio padrão (σ) das contagens. Todos os cálculos foram realizados com os dados transformados em \log_{10} . O LDM foi calculado pela Equação 3.2:

$$LDM = (t \times \sigma) + \bar{x} \quad \text{(Equação 3.2)}$$

Sendo t o valor de t -Student para 95% de confiança e para 6 graus de liberdade (n° de replicatas – 1).

- Limite de Quantificação do Método (LQM)

Utilizando os mesmos dados das contagens realizadas para o cálculo do LDM, o LQM foi calculado, seguindo Albano e Raya-Rodriguez (2009), pela Equação 3.3:

$$LQM = \bar{x} + (10 \times \sigma) \quad \text{(Equação 3.3)}$$

- Incerteza de Medição

O cálculo da incerteza de medição (IM) da contagem do fitoplâncton foi realizado segundo CALA (2010) e Albano e Raya-Rodriguez (2009).

Os desvios de REPE e REPRO foram os componentes de incerteza considerados no cálculo da IM e foram obtidos conforme item *Precisão*. Cada desvio foi utilizado para o cálculo do Desvio Padrão Relativo (RSD) e das Incertezas Padrão (IP), conforme Equação 3.4.

$$IP(\%) = RSD \times 100 = \left(\frac{\sigma}{\text{média das contagens}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 3.4})$$

Sendo RSD o desvio padrão relativo calculado para cada componente de incerteza, isto é, REPE e REPRO, e σ corresponde a σ_{REPE} e σ_{REPRO} .

A incerteza combinada da REPE e da REPRO (IC) e a incerteza expandida (IE), foram calculadas seguindo CALA (2010) através da Equação 3.5 e da Equação 3.6, respectivamente. k é o fator de abrangência para 95,45% de probabilidade (ABNT/INMETRO, 2003) obtido em função do grau de liberdade efetivo.

$$IC = \sqrt{(RSD_{\text{REPRO}})^2 + (RSD_{\text{REPE}})^2} \quad (\text{Equação 3.5})$$

$$IE = IC \times k \quad (\text{Equação 3.6})$$

RESULTADOS

As amostras utilizadas para avaliação da estabilidade foram coletadas em diferentes locais, como lagos de praças da cidade de Porto Alegre e estação de tratamento de esgotos, compreendendo diferentes densidades e composições de organismos fitoplanctônicos, conforme Tabela 3.1.

Cada conjunto de amostras (preservada e viva / refrigerada e não refrigerada) foi submetido à Análise de Variância (ANOVA) e para todas elas o $F_{\text{calculado}}$ foi menor do que o F_{tabelado} , com 95% de confiança, ou seja, não há diferença significativa entre os resultados das contagens das amostras viva e preservada / refrigerada e não refrigerada quando analisadas até 3 dias após a coleta. Posterior a esse tempo, ocorreu declínio da comunidade fitoplanctônica da amostra viva em relação à preservada e da amostra não refrigerada em relação à refrigerada.

Tabela 3.1. Grupos fitoplanctônicos predominantes e densidade fitoplanctônica inicial das amostras analisadas no estudo da estabilidade.

Amostra	Condição avaliada	Grupos predominantes	Densidade fitoplanctônica inicial (cél.s.mL ⁻¹)	
			A	B
1	Preservação	Cloro	3,0x10 ³	3,3x10 ³
2	Preservação	Cloro e Ciano	8,7x10 ⁴	8,5x10 ⁴
3	Preservação	Ciano	4,6x10 ⁴	4,6x10 ⁴
4	Preservação	Cloro	1,7x10 ⁴	1,7x10 ⁴
5	Preservação	Cloro	3,8x10 ⁴	3,5x10 ⁴
6	Preservação	Cloro	5,1x10 ³	5,6x10 ³
7	Preservação	Cloro	8,4x10 ³	8,0x10 ³
8	Preservação	Cloro	5,5x10 ³	5,3x10 ³
9	Preservação	Cloro e Ciano	1,3x10 ⁵	1,4x10 ⁵
10	Preservação	Cloro	6,1x10 ³	5,7x10 ³
1	Armazenamento	Cloro	3,5x10 ³	3,2x10 ³
2	Armazenamento	Cloro	9,3x10 ³	1,1x10 ⁴
3	Armazenamento	Cloro e Ciano	1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵
4	Armazenamento	Cloro	4,9x10 ⁴	4,4x10 ⁴
5	Armazenamento	Cloro	4,7x10 ³	4,6x10 ³
6	Armazenamento	Cloro e Diatom	8,3x10 ³	8,4x10 ³
7	Armazenamento	Cloro	1,5x10 ⁴	1,6x10 ⁴
8	Armazenamento	Cloro e Ciano	1,5x10 ⁵	1,7x10 ⁵
9	Armazenamento	Cloro e Diatom	1,3x10 ⁴	1,1x10 ⁴
10	Armazenamento	Cloro	1,3x10 ⁴	1,2x10 ⁴

Cloro = Clorofíceas; Ciano = Cianobactérias; Diatom = Diatomáceas

A corresponde à amostra viva quando avaliada a condição preservação e à amostra não refrigerada quando avaliada a condição armazenamento. **B** corresponde à amostra preservada quando avaliada a condição preservação e à amostra refrigerada quando avaliada a condição armazenamento.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados das replicatas do estudo da exatidão. O resultado do Teste- t mostrou que os métodos são semelhantes entre si, pois $t_{\text{calculado}}$ foi menor do que o t_{tabelado} para 95% de confiança.

Tabela 3.2. Resultados das replicatas do estudo da exatidão comparando os métodos de Sedgwick-Rafter validado e normalizado.

Réplicas	Método validado (céls.mL⁻¹)	Método normalizado (céls.mL⁻¹)
1	3,9 x10 ³	4,6 x10 ³
2	3,8 x10 ³	4,0 x10 ³
3	3,8 x10 ³	4,9 x10 ³
4	3,6 x10 ³	3,4 x10 ³
5	3,8 x10 ³	4,6 x10 ³
6	3,6 x10 ³	3,7 x10 ³
7	3,0 x10 ³	3,9 x10 ³

A metodologia utilizada para o estudo da precisão permitiu decompor a parcela da variabilidade referente a REPE e a REPRO, identificando as maiores contribuições para as possíveis variações do ensaio. O desvio de REPE foi 0,066, em \log_{10} , e o desvio de REPRO foi 0,027, em \log_{10} , mostrando que a REPE é a parcela que implica maior variação para o ensaio, contribuindo com 85%. O desvio R&R, que faz a avaliação da variabilidade total associada ao ensaio, foi de 9%, ficando dentro da faixa de aceitação proposta por AIAG (2002), ou seja, considerado Aceitável, uma vez que R&R (%) foi menor do que 10%. A Tabela 3.3 apresenta os resultados das amostras, transformados em \log_{10} , utilizados para o cálculo da precisão.

Tabela 3.3. Resultados das amostras do estudo da precisão, em \log_{10} .

Amostra	Analista 1			Analista 2		
	Via 1 *	Via 2 *	Via 3 *	Via 1 *	Via 2 *	Via 3 *
1	3,91	3,94	3,92	3,80	3,77	3,75
2	4,11	4,14	4,13	4,03	3,97	4,04
3	3,98	3,99	4,02	3,93	3,98	4,03
4	3,72	3,72	3,72	3,64	3,66	3,66
5	3,75	3,82	3,73	3,57	3,56	3,58
6	4,64	4,63	4,64	4,60	4,59	4,60
7	2,46	2,42	2,44	2,38	2,35	2,31
8	2,51	2,32	2,59	2,43	2,36	2,49
9	2,60	2,66	2,67	2,66	2,51	2,56
10	1,95	2,21	1,91	1,85	1,89	1,91
11	2,36	2,28	2,36	2,36	2,22	2,33
12	3,23	3,13	3,23	3,07	3,14	3,35
13	3,40	3,34	3,46	3,36	3,32	3,38
14	2,24	2,36	2,32	2,39	2,44	2,35
15	2,17	2,18	2,36	2,11	2,21	2,11
16	4,32	4,20	4,32	4,22	4,17	4,17
17	4,30	4,30	4,03	4,28	4,17	4,11
18	3,12	3,29	3,28	3,19	3,30	3,30
19	3,34	3,44	3,43	3,41	3,44	3,45
20	2,96	2,90	3,29	2,97	2,96	3,14

* Via 1, Via 2 e Via 3 correspondem às triplicatas analisadas de cada amostra.

A combinação dos três fatores avaliados no estudo da robustez (equipamento, frasco de coleta e tempo de análise) (Tabela 3.4) não influenciou o resultado final do ensaio. O desvio da robustez (0,023) foi menor do que o desvio da REPRO intralaboratorial (0,027), portanto, o método é considerado robusto.

De acordo com o Z-score obtido pelo laboratório, ao participar do Programa Piloto da RMRS, enviando resultados de análise da amostra viva, o desempenho foi considerado Satisfatório ($|Z| = 0,23$). Assim, confirma-se, mais uma vez, que não há diferença significativa entre os resultados de análise de amostras preservadas e amostras sem preservação.

Tabela 3.4. Resultados das replicatas do estudo da robustez avaliando a interferência dos fatores equipamento, frasco de coleta e tempo decorrido da coleta até a análise.

Réplicas	Resultados em céls.mL ⁻¹ das 8 combinações transformados em log ₁₀							
	I-M1-C	I-M1-E	I-M2-C	I-M2-E	3-M1-C	3-M1-E	3-M2-C	3-M2-E
1	3,08	3,18	3,05	3,07	3,11	3,02	3,20	3,20
2	3,16	3,08	3,03	3,16	3,12	3,05	3,11	3,15
3	3,22	3,06	3,08	3,16	3,29	3,16	3,11	3,08
4	3,22	3,11	3,02	3,05	3,20	3,15	3,29	3,19
5	3,14	3,26	3,25	3,06	3,20	3,08	3,11	3,17
6	3,11	3,14	3,15	3,18	3,09	3,14	2,94	3,18

I corresponde à análise realizada imediatamente após a coleta; **3** corresponde à análise 3 dias após a coleta; **M1** e **M2** são os dois microscópios utilizados para análise; **C** corresponde ao frasco de coleta de polietileno sem proteção luminosa; **E** corresponde ao frasco de coleta de polietileno com proteção luminosa.

O LDM calculado para a contagem de fitoplâncton foi 18 céls.mL⁻¹ e o LQM foi 58 céls.mL⁻¹.

O percentual de IM, para resultados em log₁₀ (Tabela 3.3), foi de 4%, sendo a incerteza expandida igual a 0,045, em log₁₀, com k igual a 2,03 para 95,45% de abrangência. No entanto, a expressão da IM junto com o resultado do ensaio deverá ser em intervalo, pois é melhor compreendida quando expressada na mesma unidade do resultado. Assim, como exemplo de resultado, é expresso [568 céls.mL⁻¹ (428-754 céls.mL⁻¹)].

DISCUSSÃO

Os métodos de identificação e contagem de fitoplâncton que utilizam microscopia óptica, como os métodos de Sedgwick-Rafter e Utermöhl, são amplamente utilizados para a determinação da composição de espécies, biovolume e biomassa (GOSSELAIN;

HAMILTON, 2000). No entanto, estes métodos consomem muito tempo e estão sujeitos a muitos erros de interpretação.

Além da necessidade de validar os métodos normalizados utilizados com modificação, conforme determina a NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a), o estudo de validação fornece informações a respeito do controle analítico do ensaio executado. Essas informações são importantes, principalmente para um método microscópico que, na sua origem, possui erros implícitos. Mesmo os métodos normalizados para a quantificação do fitoplâncton não fornecem dados de precisão, limites de detecção e quantificação, robustez e incerteza de medição, entre outros. Estes parâmetros só puderam ser conhecidos com a realização do estudo de validação.

O estudo da estabilidade mostrou que as amostras analisadas sem preservante fornecem os mesmos resultados das amostras preservadas com Lugol, desde que analisadas até 3 dias após a coleta, mantidas refrigeradas ou não refrigeradas. De acordo com Sant'Anna *et al.* (2006), em caso de material vivo, o processamento da amostra deve ser realizado, preferencialmente, até 24 horas após a coleta. Além disso, para manter a viabilidade dos organismos, a amostra deve ser refrigerada para diminuir o metabolismo e o consumo de oxigênio na ausência de luz. No entanto, verificou-se declínio da densidade celular, constituindo alteração significativa da amostra, a partir de 96 horas após a coleta (dados não apresentados). Isso foi observado nas amostras armazenadas com e sem refrigeração. Sendo assim, amostras que não foram refrigeradas logo após a coleta não tem sua análise comprometida ou inviabilizada, desde que a análise ocorra em até 72 horas.

O uso de amostras vivas permite uma melhor identificação dos organismos. Os métodos de contagem recomendam, inclusive, que a análise qualitativa seja feita em amostra não preservada, pois algumas características, como mobilidade, coloração e visualização de estruturas, só podem ser observadas nos organismos vivos (APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005). O Lugol altera a coloração das células, rompe vesículas de ar e pode dissolver frústulas de diatomáceas mais delicadas e escamas de silicoflagelados (CETESB, 2005). Além disso, de acordo com Hawkins *et al.* (2005), as células de cianobactérias encolhem entre 30-40% de seu volume após preservação da amostra com solução de Lugol. Isso compromete significativamente as medições celulares para cálculos dimensionais de área e volume ocupados, sendo preferível a utilização de amostras não preservadas para essa finalidade. No entanto, essa não é a recomendação dos métodos normalizados.

O método validado mostrou-se equivalente aos métodos normalizados. Quando comparado com o método de Sedgwick-Rafter normalizado, os resultados foram similares, conforme resultados apresentados do estudo da exatidão. A participação no programa de comparação interlaboratorial da RMRS, através da quantificação de cianobactérias, evidenciou a equivalência do método de Sedgwick-Rafter com amostras vivas aos métodos de Sedgwick-Rafter e Utermöhl normalizados. Estes últimos foram utilizados pelos participantes da rodada, sendo utilizada amostra preservada com solução de Lugol para a quantificação dos organismos (RMRS, 2010).

A reprodutibilidade dos resultados de contagem pode sofrer interferência de amostragem e sub-amostragem na retirada de alíquota para processamento e posterior análise da amostra que será avaliada. Segundo Gosselain e Hamilton (2000), as interferências podem ser a baixa contagem de células, a sedimentação não aleatória dos organismos na câmara de contagem e a

presença/ausência de indivíduos coloniais e/ou filamentosos. No entanto, independente dessas interferências, o método validado mostrou-se preciso e robusto e, também, foi possível determinar o LDM e o LQM.

No estudo da precisão, os analistas avaliados possuíam graduação na área das Ciências Biológicas e receberam treinamentos específicos para a identificação e contagem do fitoplâncton. Portanto, são profissionais habilitados e atuantes na rotina de análise de amostras de mananciais superficiais. À sua disposição havia referências bibliográficas especializadas para apoio e consulta, além de materiais e equipamentos adequados à análise realizada (KARLSON *et al.*, 2010). Tudo isso contribuiu significativamente para a alta precisão obtida (desvio de R&R igual a 9%) com amostras vivas. O treinamento e a rotina de análise são fatores que contribuem para o baixo desvio de reprodutibilidade. Comparativamente, o alto desvio de repetitividade reflete a natureza da amostra biológica viva, isto é, os organismos vivos distribuem-se de forma agregada e não formam uma solução perfeita, mas uma suspensão com variabilidade inerente (ISO, 2006a).

Segundo Culverhouse *et al.* (2003), analistas humanos não são bons instrumentos de classificação e contagem. Estes autores relatam que a performance humana em identificar e classificar organismos ao microscópio é afetada por muitos fatores psicológicos, entre eles a capacidade de memorizar, a curto prazo, somente de 5 a 9 itens; fadiga e tédio; as constantes atualizações e modificações na taxonomia do fitoplâncton e tendência em superestimar a contagem pela expectativa prévia em encontrar determinado organismo na amostra.

Em função disso, comparando identificação e contagem de dinoflagelados marinhos entre analistas especialistas e atuantes na rotina de análise com métodos automatizados,

Culverhouse *et al.* (2003) obtiveram uma precisão humana semelhante ao método automatizado, de 84 a 95%. Precisão menor do que 100% deve ser entendida como normal em investigações científicas. Para monitoramento de rotina, em que há grande volume de amostras para ser processado no menor tempo possível, esse nível de precisão é aceitável e faz parte da prática laboratorial. Entretanto, utilizando o método de Utermöhl para avaliar o número mínimo de organismos que devem ser contados em uma amostra, Rott, Salmaso e Hoehn (2007) relataram uma precisão de contagem menor, de 30%.

Os fatores avaliados, que poderiam interferir no resultado analítico do método, sendo frasco de coleta com e sem proteção luminosa e o microscópio utilizado na quantificação, combinados com o tempo até a análise após a coleta da amostra, não influenciaram significativamente nos resultados. Portanto, o método mostrou-se robusto.

De acordo com ISO/TR 13843 (ISO/TR, 2001), resultados de contagem seguem a distribuição de Poisson e, por isso, apresentam LDM teórico de 3 cél.mL⁻¹. Já para LeGresley e McDermott (2010), o limite de detecção do método é de 1 cél.mL⁻¹. Utilizando a metodologia de cálculo do LDM e do LQM para ensaios químicos, estes limites foram calculados para o método validado. Assim, os resultados obtidos refletem a realidade da análise, uma vez que foram obtidos experimentalmente e sob as mesmas condições analíticas. O conhecimento desses limites é mais uma maneira de garantir qualidade e confiabilidade analítica dos resultados dos ensaios. Abaixo dos limites estabelecidos, o resultado não possui grau de precisão e exatidão aceitáveis, portanto, não sendo possível expressá-lo numericamente. Portanto, os limites devem ser fornecidos junto com o resultado da amostra analisada para que o cliente possa interpretar o resultado fornecido pelo laboratório.

A incerteza está relacionada a um resultado de medição e não ao valor verdadeiro do mensurando que, na prática, não é conhecido. Ela caracteriza um intervalo ou faixa de dispersão, e não um valor pontual. Logo, a incerteza é a dúvida remanescente associada ao resultado da medição correspondendo a uma faixa de valores que podem ser atribuídos ao mensurando, não devendo ser entendida como uma “faixa de segurança” (ALBANO E RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

De acordo com ISO/TS 19036 (ISO/TS, 2006), RMRS (2009) e Albano e Raya-Rodriguez (2009), a principal fonte de incerteza para ensaios biológicos é a REPRO intralaboratorial. Além disso, é difícil quantificar com confiabilidade a contribuição de cada passo do processo analítico, pois o analito são organismos vivos que podem estar com estado fisiológico variado, incluindo diferentes cepas, gêneros e espécies. Assim, análises biológicas não permitem rigor metrológico e a determinação da incerteza de medição requer uma abordagem de estimativa da incerteza total, não separando as fontes de incerteza de entrada individualmente (ISO/TS, 2006). Os estudos de REPE e REPRO forneceram os dados para o cálculo da IM, uma vez que eles consideram todos os fatores significativos de influência no ensaio, incluindo processos de concentração, diluição e homogeneidade das amostras. Os resultados obtidos mostraram que a REPE é uma importante fonte de incerteza, inclusive com parcela de contribuição maior do que a REPRO intralaboratorial.

CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitiram validar o método de Sedgwick-Rafter para a quantificação do fitoplâncton com amostras vivas. Dessa forma, cumpre-se com o exigido pela NBR

ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a), isto é, métodos normalizados utilizados com alterações ou modificações devem ser validados. O método agora validado pode ser utilizado na rotina de análises em laboratório.

Os resultados obtidos através da estabilidade, da exatidão e do Z-score mostraram não haver diferença significativa entre o uso de amostras vivas e amostras preservadas com solução de Lugol, nem entre o uso dos métodos normalizados de Sedgwick-Rafter e Utermöhl. Também através da estabilidade foi possível estabelecer um prazo de 72 horas após a coleta para a análise das amostras. Nesse período, as amostras podem ficar ou não sob refrigeração.

O método foi considerado robusto, uma vez que as variações aplicadas não alteraram significativamente os resultados. Portanto, frasco com ou sem proteção luminosa, equipamento utilizado e tempo decorrido da coleta até a análise não são fatores críticos para o ensaio quantitativo do fitoplâncton. A análise de amostra imediatamente após a coleta e 3 dias após a coleta confirma o resultado obtido no estudo da estabilidade, de que as amostras vivas podem ser analisadas até 72 horas após a coleta.

O estabelecimento dos limites de detecção e quantificação do método, da precisão e, também, da incerteza de medição conferem qualidade analítica aos resultados dos ensaios. Através de um maior conhecimento do método utilizado, há possibilidade de aperfeiçoamento dos analistas e da execução das etapas do método. Tudo isso a fim de buscar melhoria contínua e garantir exatidão, precisão e confiabilidade analíticas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório Central de Águas da Companhia Riograndense de Saneamento, em especial, Andréa dos Anjos, Aurea Giordani e Juliana Frizzo, pela compreensão e aceitação da proposta de trabalho, apoio e colaboração na execução das análises e disponibilidade da infra-estrutura e equipamentos utilizados no decorrer deste estudo; ao Setor de Hidrobiologia da Divisão de Pesquisas do Departamento Municipal de Água e Esgoto de Porto Alegre, especialmente Rodrigo da Rocha Andrade, pelos estudos comparativos; à Rede Metrológica do Estado do Rio Grande do Sul, destacando Filipe de Medeiros Albano, pelos esclarecimentos em relação às análises estatísticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais**. Guia Prático. Porto Alegre, RS: Rede Metrológica RS, 2009. 136p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION (APHA; AWWA; WEF). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21 ed. Washington, D.C., 2005.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). **D4148-82: Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method**. Estados Unidos, 2004. 3p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (ABNT; INMETRO). **Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM)**. 3 Ed. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**. Rio de Janeiro, 2005a.

AUTOMOTIVE INDUSTRY ACTION GROUP (AIAG). **Measurement Systems Analysis**. 3. Ed. Detroit: Chrysler Corporation, Ford Motor Company and General Motors Corporation, 2002.

BEUTLER, M. *et al.* A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. **Photosynthesis Research**, n. 72, p. 39-53, 2002.

BRANCO, S. M. **Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária**. 3ª Ed. São Paulo, SP: CETESB/ASCETESB, 1986. 640p.

BRUCE, P., MINKKINEN, P., RIEKKOLA, M. L. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. **Mikrochimica Acta**, v. 128, p. 93-106. 1998.

CANADIAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION INC. (CALA). **Measurement Uncertainty Policy**. P19, Revision 1.10, 2010.

CARNEIRO, C.; PEGORINI, E. S.; ANDREOLI, C. V. Introdução. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 1. p. 25-44.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Norma Técnica L5.303: Fitoplâncton de Água Doce - Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio)**. São Paulo, 2005.

CULVERHOUSE, P. F. *et al.* Do experts make mistakes? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. **Marine Ecology Progress Series**, v. 247, p. 17-25, 2003.

DIERCKX, S.; METFIES, K.; MEDLIN, L. Electrochemical detection of toxic algae with a biosensor. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis**. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

DI BERNARDO, L. **Algas e suas Influências na Qualidade das Águas e nas Tecnologias de Tratamento**. Rio de Janeiro, RJ: ABES, 1995. 140p.

DUBELAAR, G. B. J. *et al.* Design and First Results of CytoBuoy: A Wireless Flow Cytometer for In Situ Analysis of Marine and Fresh Waters. **Cytometry**, v. 37, p. 247-254, 1999.

DUBELAAR, G. B. J.; GERRITZEN, P. L. CytoBuoy: a step forward towards using flow cytometry in operational oceanography. **Scientia Marina**, v. 64, n. 2, p. 255-265, 2000.

EDLER, L.; ELBRÄCHTER, M. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis**. UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **LG401: Standard Operating Procedure for Phytoplankton Analysis**. Revision 4. Estados Unidos, 2004.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 1998. 602p.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (CEN). **EN 15204: Water Quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)**. União Européia, 2006.

GALLUZZI, L.; PENNA, A. Quantitative PCR for detection and enumeration of phytoplankton. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis**. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

GESCHER, C.; METFIES, K.; MEDLIN, L.K. Hybridisation and microarray fluorescent detection of phytoplankton. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis**. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

GOSSELAIN, V.; HAMILTON, P. B. Algamica: revisions to a key-based computerized counting program for free-living, attached, and benthic algae. **Hydrobiologia**, v. 438, p. 139-142, 2000.

GREGOR, J. *et al.* In situ quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. **Hydrobiologia**, n. 548, p. 141-151, 2005.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. **Water Research**, v. 38, p. 517-522, 2004.

HAWKINS, P. R. *et al.* Change in cyanobacterial biovolume due to preservation by Lugol's Iodine. **Harmful Algae**, v. 4, 1033-1043, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos analíticos. Revisão 03.** 2010. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 19458: Water quality – Sampling for microbiological analysis.** Suíça, 2006a.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION / TECHNICAL REPORT (ISO/TR). **ISO/TR 13843: Water quality – Guidance on validation of microbiological methods.** Suíça, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION / TECHNICAL SPECIFICATION (ISO/TS). **ISO/TS 19036: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines of the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations.** Suíça, 2006.

KARLSON, B. *et al.* Introduction to methods for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis.** UNESCO (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris, 2010.

LAWTON, L. *et al.* Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.) **Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management.** Published on behalf of WHO – World Health Organization by Taylor and Francis. London & New York, 1999. 416p.

LEBOULANGER, C. *et al.* Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 30, p. 83-99, 2002.

LEGRESLEY, M.; MCDERMOTT, G. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis – haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell.

In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis**. UNESCO (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris, 2010.

MARRIN III, R.; SCHOLIN, C. A. Toxic algal detection using rRNA-targeted probes in a semi-automated sandwich hybridization format. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) **Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis**. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

MÜLLER, C. C.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; CYBIS, L. F. Diagnóstico da qualidade analítica na quantificação de cianobactérias. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 15, n. 3, p. 283-290, 2010.

OLSON, R. J.; SHALAPYONOK, A.; SOSIK, H. J. An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot. **Deep-Sea Research – Part I**, v. 50, p. 301-315, 2003.

REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). **Metrologia: A base física da qualidade**. CD-ROM, Rede Metrológica do Rio Grande do Sul, 2003.

REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). **RM68 – Incerteza de medição: guia prático do avaliador de laboratórios**. Revisão 03. Porto Alegre, 2009.

REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). **Relatório de 2010 – Programa Piloto de Ensaio de Proficiência em Cianobactérias**. Porto Alegre, 2010.

ROTT, E.; SALMASO, N.; HOEHN, E. Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates – an easy task or a Gordian knot? **Hydrobiologia**, v. 578, p. 141-146, 2007.

SANT'ANNA, C. L. *et al.* **Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras**. Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006, 58p.

SIERACKI, C. K.; SIERACKI, M. E.; YENTSCH, C. S. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. **Marine Ecology Progress Series**, v. 168, p. 285-296, 1998.

SOSIK, H. M. et al. Growth rates of coastal phytoplankton from time-series measurements with a submersible flow cytometer. **Limnology and Oceanography**, v. 48, n. 5, p. 1756-1765, 2003.

SOSIK, H. M.; OLSON, R. J. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 5, p. 204-216, 2007.

THYSSEN, M. *et al.* The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. **Journal of Plankton Research**, v. 30, n. 3, p. 333-343, 2008.

XAVIER, C. F.; DIAS, L. N.; BRUNKOW, R. F. Eutrofização. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) **Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados**. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 8. p. 271-302.

CAPÍTULO 4: MONITORAMENTO DO
FITOPLÂNCTON PARA A QUALIDADE
DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO
PÚBLICO – ESTUDO DE CASO DE
MANANCIAS DO RIO GRANDE DO SUL

MONITORAMENTO DO FITOPLÂNCTON PARA A QUALIDADE DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO – ESTUDO DE CASO DE MANANCIASIS DO RIO GRANDE DO SUL *

Carla Cristine Müller

Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN).
ccmuller@terra.com.br

Luiz Fernando Cybis

Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
lfcybis@iph.ufrgs.br

Maria Teresa Raya-Rodriguez

Centro de Ecologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
raya.rodriguez@ufrgs.br

RESUMO

A qualidade da água dos mananciais deve ser monitorada para utilização em abastecimento público. A Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece o padrão de potabilidade brasileiro que deve ser seguido pelas empresas e companhias de saneamento. Dentre os parâmetros a serem avaliados está a densidade de cianobactérias. Estes organismos, bem como outros grupos fitoplanctônicos, podem gerar problemas para o tratamento da água, como odor, sabor e colmatação de filtros das estações de tratamento de água. Além disso, a ocorrência de florações de cianobactérias gera preocupação pela potencial produção de toxinas. Por isso, métodos de coleta e de análise confiáveis devem ser utilizados para sua avaliação. Neste trabalho foi realizado um monitoramento mensal, durante o ano de 2009, em seis mananciais de captação de água para consumo humano. Foram analisados parâmetros

* Manuscrito submetido à Revista Brasileira de Recursos Hídricos.

físico-químicos e a densidade fitoplanctônica. Os resultados mostraram a ocorrência de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas em três locais avaliados. A partir desses dados, evidenciou-se a importância do monitoramento desses organismos nos mananciais utilizados para abastecimento público.

Palavras-chave: fitoplâncton, cianobactérias, monitoramento, água para abastecimento público, método de Sedgwick-Rafter.

ABSTRACT

The sanitary quality of water sources should be monitored for use in public supply. The Decree No. 518/2004 of the Ministry of Health establishes the Brazilian pattern for drinking water which must be followed by water companies. Among the parameters to be evaluated is the density of cyanobacteria. These organisms, as well as other phytoplankton groups, can create problems for water treatment, such as odor, taste and clogging of filters of water treatment plants. Furthermore, the occurrence of cyanobacterial blooms has increased concern for potential toxin production. Therefore, methods of collection and analysis should be used for reliable evaluation. In this work, monitoring was conducted on a monthly basis during the 2009, in six water sources. Physico-chemical parameters and phytoplanktonic density were analyzed. The results showed the occurrence of blooms of potentially toxic cyanobacteria in three places. From these data, the study showed the importance of monitoring these organisms in water sources used for public supply.

Keywords: phytoplankton, cyanobacteria, monitoring, public water supply, Sedgwick-Rafter method.

INTRODUÇÃO

Os mananciais de água doce devem ser classificados a fim de assegurar seus usos preponderantes, segundo a Resolução nº 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005), pois apresentam uma crescente e progressiva deterioração da qualidade das águas. Dentre os usos múltiplos (navegação, recreação, abastecimento, irrigação, etc.), a prioridade é a sua utilização para abastecimento público e dessedentação de animais, em situações de escassez (BRASIL, 1997). A demanda de consumo de água tem aumentado significativamente e a disponibilidade hídrica em condições de utilização para fornecimento à população não tem crescido na mesma proporção (CARNEIRO *et al.*, 2005).

Os ambientes aquáticos possuem comunidades fitoplanctônicas com variedade, abundância e distribuição próprias que dependem de características abióticas (temperatura, luz, oxigênio dissolvido e concentração de nutrientes) e bióticas (predadores, parasitas, competição). Em geral, quando é extraída e analisada uma amostra do fitoplâncton de um corpo hídrico, principalmente mananciais com circulação relativamente fechada, como lagos e represas, é comum a presença de cianobactérias, clorofíceas e diatomáceas, embora as espécies presentes possam variar de um ambiente a outro (DI BERNARDO, 1995). Além disso, cada ambiente apresenta variações sazonais na composição do fitoplâncton, que definem o ciclo anual (FIGUEIREDO; GIANI, 2009). Também deve ser considerada a influência da ação humana, que acarreta mudanças significativas na comunidade fitoplanctônica (DI BERNARDO, 1995), a hidrodinâmica e a profundidade do corpo hídrico (REYNOLDS; IRISH; ELLIOTT, 2001).

Nos ambientes de água doce, há coexistência de um grande número de espécies de algas fitoplanctônicas. Geralmente, duas ou mais espécies tornam-se dominantes no ambiente,

enquanto conjuntamente pode ser encontrado um grande número de espécies raras e subdominantes. As mudanças constantes do ambiente e as relações entre espécies, não proporcionam um ambiente uniforme por períodos longos de tempo, proporcionando um processo lento de exclusão competitiva e gerando um equilíbrio misto de populações (WETZEL, 1993; FIGUEIREDO; GIANI, 2001, 2009). A composição final do fitoplâncton é a consequência de um balanço entre perdas e ganhos dentro do grupo de espécies que tem adaptações para sobreviver no ambiente (ANNEVILLE, *et al.* 2004).

Os fatores ambientais mais importantes que interferem e regulam o desenvolvimento desses organismos, selecionando os mais adaptados à condição particular do ambiente, são intensidade luminosa, temperatura, sedimentação e distribuição vertical dos organismos na coluna d'água, disponibilidade de nutrientes no meio aquático, competição e alelopátia com demais produtores primários, além da predação pelo zooplâncton. Em reservatórios de abastecimento profundos, também são importantes os processos de estratificação e os regimes de mistura da água (WETZEL, 1993; ANNEVILLE, *et al.*, 2004; FIGUEIREDO; GIANI, 2001, 2009).

A comunidade aquática responde rapidamente às alterações das condições do ambiente, seja pela redução de espécies, seja pela ocorrência de florações, isto é, aumento da biomassa de uma ou mais espécies presentes no ambiente. Nas florações predominam espécies de cianobactérias, principalmente, em mananciais localizados em áreas urbanizadas e nos meses mais quentes do ano (ESTEVES, 1998; XAVIER, *et al.*, 2005). Estes ambientes geralmente encontram-se eutrofizados, isto é, com uma carga de nutrientes acima do que é característico do local, proveniente de despejos não tratados (industriais, domésticos e/ou agrícolas). Além disso, problemas sanitários também são observados com o aumento da densidade

fitoplanctônica, como obstrução de filtros em Estações de Tratamento de Água (ETAs), aumento dos custos com produtos químicos para o tratamento da água e sabor e odor desagradáveis nas águas de abastecimento (BRANCO, 1986; DI BERNARDO, 1995; CARNEIRO *et al.*, 2005). O problema mais grave, e que pode ser observado em casos de florações, é a toxicidade de algumas espécies de cianobactérias, pois são organismos capazes de liberar compostos potencialmente tóxicos na água, gerando dificuldades no tratamento.

Para operar um sistema de abastecimento público de água que atenda ao padrão de potabilidade brasileiro, é necessário seguir a Portaria nº 518 (BRASIL, 2004a). Em relação ao fitoplâncton, esta Portaria exige monitoramento mensal do número de células de cianobactérias, na água do manancial, até 10.000 céls.mL⁻¹. Acima desse valor, o monitoramento deve ser semanal. Nos casos em que a densidade de cianobactérias for maior do que 20.000 céls.mL⁻¹, deve ser feito o controle semanal, na água tratada, quanto às cianotoxinas (BRASIL, 2004a). Além disso, esta situação pode desencadear alterações no processo de tratamento nas ETAs, com a utilização de etapas complementares, como a adsorção em carvão ativado.

Portanto, para assegurar a qualidade da água tratada, é fundamental que seja realizado um monitoramento adequado da água bruta. Nesse sentido, a análise de quantificação do fitoplâncton, principalmente do grupo das cianobactérias, deve ser realizada utilizando métodos apropriados e que gerem resultados confiáveis. Cabe ressaltar que a análise qualitativa também deve ser confiável, pois dela depende a correta contagem dos organismos.

O objetivo deste trabalho é enfatizar a importância da análise do fitoplâncton para garantir a qualidade da água distribuída à população. Para isso serão apresentados dados do

monitoramento de seis mananciais utilizados para abastecimento público no Rio Grande do Sul, destacando a existência de florações de cianobactérias potencialmente tóxicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os seis locais de amostragem são mananciais utilizados para captação de água para consumo humano pela Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) (Tabela 4.1). Estes mananciais compreendem rios, lagoas e reservatórios (barragens) de diferentes municípios do interior do Rio Grande do Sul (Figura 4.1).



Figura 4.1. Localização dos municípios gaúchos aos quais pertencem os mananciais amostrados. Fonte: Adaptado de Ministério dos Transportes.

Tabela 4.1. Caracterização dos mananciais amostrados.

Manancial	Tipo de manancial	Município de localização	Ocorrência de florações de cianobactérias
B1	Barragem	Santiago	Sim
B2	Barragem	Unistalda	Não
B3	Barragem	Vacaria	Não
B4	Barragem	Farroupilha	Sim
C	Canal proveniente de lagoa	Osório	Sim
R	Rio	Canela	Não

As amostras, correspondendo à água bruta que chega à ETA para ser tratada, foram coletadas em frascos de polietileno branco leitoso com capacidade para 1L, mensalmente, durante o ano de 2009, pelas ETAs de cada município. Nos laboratórios das ETAs foram realizadas as análises de parâmetros físico-químicos segundo métodos descritos em procedimentos internos da Companhia, elaborados pela Superintendência de Tratamento (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Parâmetros físico-químicos analisados e métodos analíticos utilizados.

Parâmetro	Unidade	Método de análise	Procedimento Interno
Temperatura da água	°C	Termometria	FQ-S 001 Rev. 01 Out. 2006
Cor	mg.L ⁻¹ Pt	Comparação visual	FQ-S 005 Rev. 01 Out. 2006
Turbidez	NTU	Nefelométrico	FQ-S 003A Rev. 01 Out. 2006 FQ-S 003B Rev. 01 Out. 2006
Oxigênio dissolvido	mg.L ⁻¹ O ₂	Winkler	FQ-S 008 Rev. 01 Out. 2006
pH	-	Colorimétrico	FQ-S 002A Rev. 01 Out. 2006

A análise do fitoplâncton foi realizada no Laboratório Central de Águas da CORSAN utilizando o método de Sedgwick-Rafter (APHA; AWWA; WEF, 2005). No entanto, as amostras foram analisadas sem preservação, de acordo com o método validado pelo

Laboratório (MÜLLER; RAYA-RODRIGUEZ; CYBIS, *no prelo*). A concentração das amostras, quando necessária, foi realizada através de centrifugação de 100 mL por 20 minutos a 2.500 rpm. As câmaras de contagem de Sedgwick-Rafter tem um volume fixo de amostra de 1 mL. Após preparadas, as câmaras foram observadas ao microscópio óptico comum para identificação e quantificação dos organismos. Na análise qualitativa, os organismos foram identificados em nível de gênero e classificados nos seguintes grupos, de acordo com a engenharia sanitária (PALMER, 1962): cianobactérias, algas verdes, diatomáceas e fitoflagelados (todas as algas que se movimentam através de flagelo). Os critérios de contagem seguiram CETESB (2005).

RESULTADOS

A Tabela 4.3 mostra uma caracterização físico-química dos mananciais estudados e sua classificação segundo CONAMA (2005), sendo os mananciais B2, B3 e R enquadrados na classe 1; B1, na classe 2; B4 e C, na classe 3. Na Tabela 4.4 são apresentados os dados do monitoramento quali-quantitativo do fitoplâncton, bem como a classificação preliminar dos ambientes aquáticos de acordo com a densidade fitoplanctônica (MARGALEF, 1983). A condição eutrófica foi predominante, ocorrendo em quatro mananciais (B1, B2, B3 e C). O manancial B4 apresentou-se hipereutrófico e o manancial R, oligotrófico. A classificação dos mananciais como eutrófico, poderia ser melhor compreendida analisando dados de concentração de fósforo, pois somente os mananciais B1 e C apresentaram floração de cianobactérias. No entanto, essas análises não foram realizadas, pois não fazem parte da rotina de monitoramento desses mananciais.

Tabela 4.3. Caracterização físico-química dos mananciais estudados.

Manancial		Temperatura da água	Cor	Turbidez	pH	OD	Classe de qualidade*
		°C	mg.L ⁻¹ Pt	NTU		mg.L ⁻¹ O ₂	
B1	Média ± DP	20 ± 5	154 ± 33	50 ± 18	6,6 ± 0,3	7,3 ± 1,5	2
	Mín	13	100	27	6,3	5,0	
	Máx	27	200	73	7,3	9,4	
B2	Média ± DP	20 ± 4	87 ± 38	9,3 ± 5	7,1 ± 0,2	8,1 ± 0,8	1
	Mín	13	25	4,2	6,7	6,2	
	Máx	28	160	20	7,5	9,0	
B3	Média ± DP	18 ± 4	72 ± 19	12 ± 3	6,6 ± 0,2	7,3 ± 1,0	1
	Mín	10	40	8,4	6,0	6,0	
	Máx	23	100	19	6,9	9,6	
B4	Média ± DP	18 ± 4	66 ± 35	9,5 ± 6	7,0 ± 0,1	6,2 ± 1,3	3
	Mín	12	15	3,1	6,9	4,8	
	Máx	24	110	22	7,1	9,0	
C	Média ± DP	22 ± 4	76 ± 22	16 ± 7	6,8 ± 0,1	3,5 ± 2,3	3
	Mín	15	50	4,3	6,5	0,4	
	Máx	26	110	28	6,9	8,6	
R	Média ± DP	17 ± 4	49 ± 23	8,7 ± 6	6,7 ± 0,1	8,4 ± 0,8	1
	Mín	11	30	2,8	6,7	6,2	
	Máx	23	90	24	6,9	8,4	

OD = Oxigênio dissolvido

* Classes de qualidade segundo CONAMA (2005).

DP = Desvio padrão

Tabela 4.4. Caracterização fitoplanctônica dos mananciais estudados.

Manancial		Fitoplâncton	Cianobactérias	Algas verdes	Diatomáceas	Fitoflagelados	Classificação [#]
		céls.mL ⁻¹					
B1	Média ± DP	7.239 ± 14.536	8.380 ± 15.577	17 ± 23	158 ± 81	92 ± 127	Eutrófico
	Mín	36	*	*	34	*	
	Máx	38.816	38.564	75	246	328	
B2	Média ± DP	1.483 ± 1.715	291 ± 1	754 ± 966	760 ± 897	56 ± 62	Eutrófico
	Mín	12	*	11	*	*	
	Máx	6.612	291	3.358	3.082	172	
B3	Média ± DP	3.695 ± 4.826	234 ± 339	606 ± 1.602	3.088 ± 4.750	44 ± 62	Eutrófico
	Mín	129	*	*	17	3	
	Máx	14.894	625	5.158	14.873	229	
B4	Média ± DP	600.670 ± 758.785	599.296 ± 759.588	249 ± 373	1.226 ± 2.663	103 ± 88	Hipereutrófico
	Mín	85	28	1	*	5	
	Máx	2.052.425	2.052.425	1.332	8.360	266	
C	Média ± DP	6.966 ± 9.770	8.220 ± 10.207	95 ± 152	28 ± 28	16 ± 35	Eutrófico
	Mín	14	*	*	*	*	
	Máx	26.043	26.020	461	81	102	
R	Média ± DP	683 ± 952	439 ± 471	98 ± 104	383 ± 513	20 ± 15	Oligotrófico
	Mín	103	*	21	28	5	
	Máx	3.086	1.039	365	1.656	45	

DP = Desvio padrão * Devido à baixa densidade, organismos não foram contados na análise quantitativa.

Classificação dos ambientes aquáticos segundo Margalef (1983).

Os pontos B1, C e B4 apresentaram floração de cianobactérias durante o ano de 2009. Os eventos de floração foram considerados a partir de contagens próximas a 10.000 céls.mL⁻¹. O ponto B1 apresentou floração de *Planktothrix sp.* nos meses de março e abril. Nos meses de janeiro, março, junho e julho ocorreu floração de *Microcystis sp.* no ponto C. Já no ponto B4, houve floração de *Cylindrospermopsis raciborskii* de março a agosto. Nos pontos B2, B3 e R não foi verificada ocorrência de floração de cianobactérias. Entretanto, no ponto B3, observou-se um incremento de diatomáceas do gênero *Asterionella* nos meses de novembro e dezembro.

A Figura 4.2 mostra as densidades de fitoplâncton total e de cianobactérias. Nos locais onde ocorreu floração de cianobactérias (Gráficos A, D e E), a quantificação desses organismos foi aproximadamente igual a contagem total de organismos. Já nos outros locais, onde não foram observadas essas florações, a contagem de cianobactérias foi inferior à contagem total do fitoplâncton. Nestes mananciais (Gráficos B, C e F), o monitoramento revelou a ocorrência de algas verdes e diatomáceas.

Os gêneros fitoplanctônicos encontrados em cada manancial, durante o período de monitoramento, estão apresentados na Tabela 4.5. Os gêneros foram classificados em cianobactérias, algas verdes, diatomáceas e fitoflagelados (PALMER, 1962).

DISCUSSÃO

O monitoramento realizado nos pontos de amostragem faz parte das exigências da Portaria nº 518 (BRASIL, 2004a), ou seja, o parâmetro densidade celular de cianobactérias deve ser analisado, mensalmente, no ponto de captação dos mananciais utilizados para abastecimento

público. Nesse sentido, a CORSAN analisa, também, a densidade fitoplânctônica total, cujos dados foram aqui utilizados, pois outros organismos podem interferir no tratamento da água.

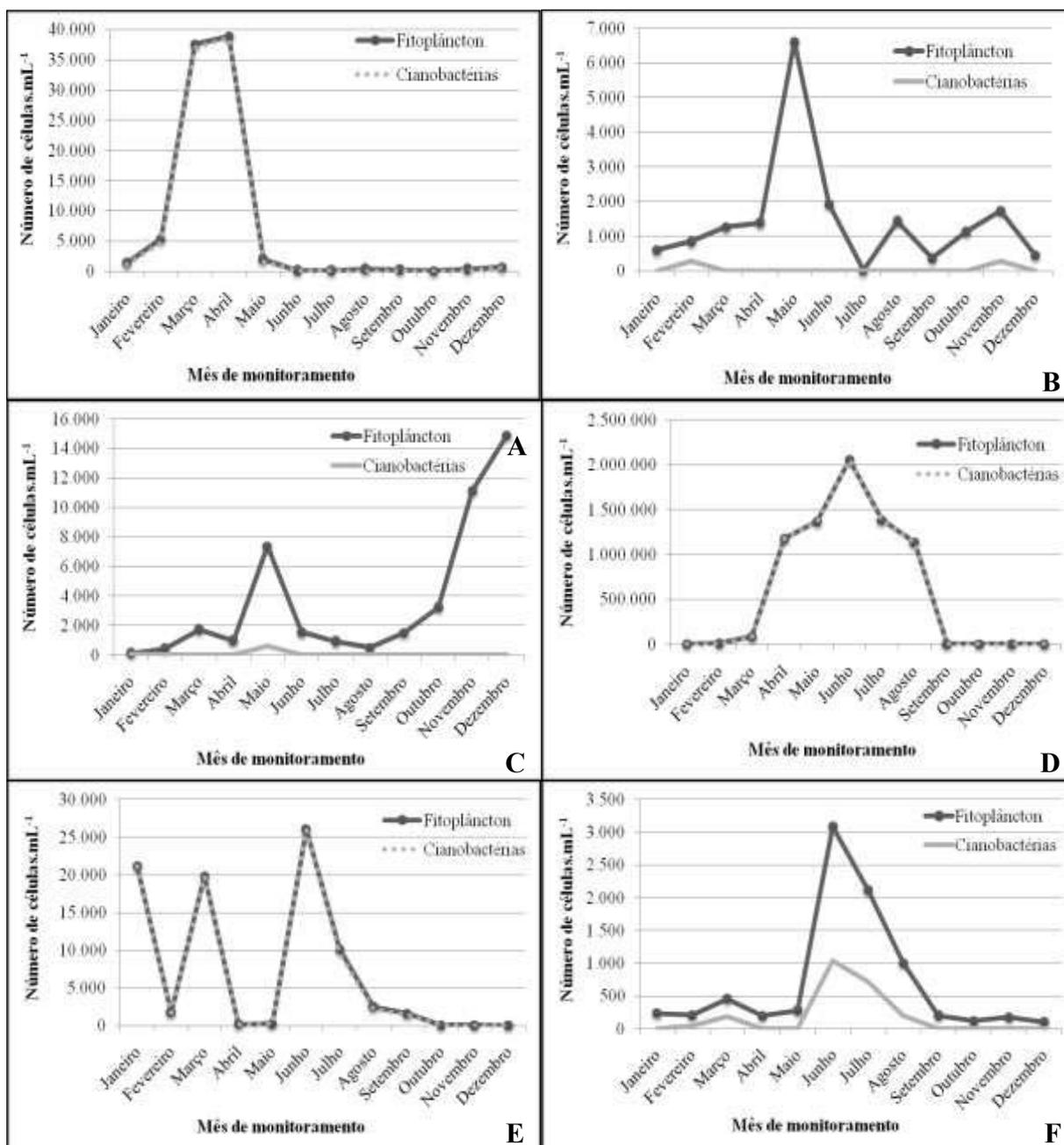


Figura 4.2. Densidades de fitoplâncton total e cianobactérias durante o ano de 2009 nos 6 pontos de amostragem. A. Manancial B1. B. Manancial B2. C. Manancial B3. D. Manancial B4. E. Manancial C. F. Manancial R.

Tabela 4.5. Gêneros fitoplanctônicos identificados nos mananciais estudados.

	Gêneros	Mananciais						
		B1	B2	B3	B4	C	R	
Cianobactérias	Anabaena	X	X	X	X	X	X	
	Aphanizomenon			X		X	X	
	Aphanocapsa	X				X		
	Aphanotece				X	X		
	Chroococcus	X	X			X		
	Cylindrospermopsis			X	X	X	X	
	Geitlerinema		X			X	X	
	Merismopedia				X	X	X	
	Microcystis	X		X	X	X		
	Oscillatoria	X		X	X	X	X	
	Phormidium		X			X	X	
	Planktothrix	X				X	X	
	Pseudanabaena		X			X		
	Woronichinia		X	X				
	Algas verdes	Ankistrodesmus		X	X		X	X
		Chlorococcum		X	X			
Closteriopsis				X				
Closterium		X	X	X	X	X	X	
Coelastrum				X	X			
Cosmarium		X	X		X	X	X	
Crucigenia			X			X	X	
Desmidium			X	X				
Desmodesmus		X	X	X	X	X	X	
Dictyosphaerium		X	X	X	X	X	X	
Elakatothrix		X	X	X	X	X	X	
Errerella				X	X			
Euastrum			X	X	X		X	
Gloeocystis			X					
Golenkinia						X	X	
Golenkiniopsis						X	X	
Kirchneriella					X		X	
Lagerheimia						X	X	
Micractinium		X	X			X	X	
Micrasterias			X	X				
Monoraphidium		X	X	X	X	X	X	
Mougeotia		X				X	X	
Oocystis			X	X	X	X	X	
Pediastrum			X	X	X	X	X	
Scenedesmus		X	X	X	X	X	X	
Schroederia			X			X		
Selenastrum					X			
Sphaerocystis		X	X	X	X	X	X	
Spirogyra				X				
Staurastrum		X	X	X	X	X	X	
Staurodesmus		X	X	X	X	X	X	
Teilingia	X	X	X	X	X	X		
Tetraedron	X	X	X	X	X	X		
Tetraplecton				X				
Tetrastrum				X				

Tabela 4.5. (Continuação) Gêneros fitoplanctônicos identificados nos mananciais estudados.

	Gêneros	Mananciais					
		B1	B2	B3	B4	C	R
Diatomáceas	Achnanthes				X		X
	Amphora						X
	Asterionella						X
	Aulacoseira	X	X	X	X	X	X
	Cyclotella	X	X	X	X	X	X
	Cymbella	X	X	X	X	X	X
	Diploneis	X	X	X	X	X	X
	Eunotia	X	X	X	X	X	X
	Fragilaria	X	X	X	X	X	X
	Gomphonema	X	X	X	X	X	X
	Gyrosigma			X			
	Melosira					X	
	Navicula	X	X	X	X	X	X
	Nitzschia	X	X	X	X	X	X
	Pinnularia	X	X	X	X	X	X
	Surirella	X	X	X	X	X	X
	Synedra	X	X	X	X	X	X
	Ulnaria	X	X	X	X	X	X
Urosolenia							
Fitoflagelados	Chlamydomonas	X	X	X	X	X	X
	Chlorogonium						X
	Chrysococcus	X	X	X	X	X	X
	Cryptomonas	X	X	X	X	X	X
	Dynobryon	X	X	X	X	X	X
	Dysmorphococcus			X			X
	Eudorina	X	X	X	X	X	X
	Euglena	X	X	X	X	X	X
	Glenodinium	X	X	X	X	X	X
	Gymnodinium	X	X	X	X	X	X
	Lepocinclis	X	X	X	X	X	X
	Mallomonas	X	X	X	X	X	X
	Pandorina	X	X	X	X	X	X
	Peridinium	X	X	X	X	X	X
	Phacus	X	X	X	X	X	X
	Pteromonas	X	X	X	X	X	X
	Strombomonas	X	X	X	X	X	X
	Synura			X			X
Trachelomonas	X	X	X	X	X	X	
Vacuolaria	X	X	X	X	X	X	

Odor e sabor desagradáveis na água podem ser provocados por cianobactérias, como também por diatomáceas e fitoflagelados; além disso, podem provocar cor e obstruir os filtros das ETAs (PALMER, 1962; BRANCO, 1986; DI BERNARDO, 1995). A análise de cianotoxinas

foi realizada quando necessário, porém, não foram aqui apresentadas por não pertencerem ao escopo desta discussão.

No monitoramento fitoplanctônico foi utilizado o método de contagem validado pelo Laboratório Central de Águas da CORSAN (MÜLLER; RAYA-RODRIGUEZ; CYBIS, *no prelo*), demonstrando uma aplicação prática e viável da utilização de amostras vivas na contagem do fitoplâncton. As normas de qualidade, como a ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a), exigem que os métodos de ensaio utilizados pelo laboratório sejam normalizados, isto é, publicados em normas nacionais ou internacionais. Métodos normalizados utilizados fora do seu escopo original ou com modificações também podem ser usados, desde que estejam validados. Essas amostras utilizadas para contagem, segundo o método de Sedgwick-Rafter (BRANCO, 1986; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005; LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010) validado (MÜLLER; RAYA-RODRIGUEZ; CYBIS, *no prelo*), possibilitaram rapidez na análise e na tomada de decisões.

A concentração das amostras, quando necessária, por centrifugação e o tempo reduzido para sedimentação das câmaras de contagem (tempo de sedimentação de 15 minutos) permitiram que muitas amostras fossem analisadas no mesmo dia, inclusive com a obtenção do resultado final. Assim, em casos de florações de cianobactérias ou qualquer problema observado no processo de tratamento da água, relacionado com organismos fitoplanctônicos, medidas de controle ou prevenção puderam ser adotadas rapidamente. Em casos de proximidade entre o local afetado e o Laboratório Central, muitas vezes a amostra foi coletada e o resultado final da análise obtido no mesmo dia. Além disso, as amostras vivas não geraram resíduos químicos relacionados ao uso de substâncias preservantes, eliminando impactos ambientais relacionados ao descarte de rejeitos laboratoriais.

A classificação dos mananciais, proposta por Margalef (1983), relacionando o estado trófico com a densidade fitoplanctônica (Tabela 4.4) mostrou o impacto da eutrofização sobre os mananciais estudados. Somente um ambiente ficou na categoria oligotrófico. Os ambientes eutrofizados causam outros efeitos indesejáveis, além da proliferação excessiva do fitoplâncton. Dentre eles podem ser destacados (DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010) 1) a liberação de cianotoxinas; 2) problemas recreacionais e estéticos em função das florações algais, proliferação de insetos, geração de odores; 3) mortalidade de peixes e 4) maiores dificuldades e elevação de custos para o tratamento da água.

A classificação apresentada na Tabela 4.4 não pode ser considerada definitiva, pois avaliou somente o ponto de captação de água no manancial, não abrangendo outros pontos que poderiam melhor caracterizar o ambiente. Uma classificação que melhor reflète a realidade de cada ambiente deverá considerar diferentes pontos de amostragem, que cubram toda a extensão do manancial, a concentração de carbono bem como os teores de nutrientes. A concentração de fósforo poderia auxiliar nessa classificação e na melhor compreensão da ocorrência de florações de cianobactérias nos mananciais. Incluir a análise desse nutriente junto ao monitoramento fitoplanctônico pode ajudar a previsão da ocorrência das florações, bem como servir de alerta para o enriquecimento das águas e a eutrofização.

A classificação proposta pelo CONAMA 357 (2005) engloba esses fatores, embora não determine quais os pontos de amostragem devem ser coletados. Com a análise de poucos parâmetros dessa classificação, foi possível avaliar a condição de qualidade dos seis mananciais avaliados nesse trabalho (Tabela 4.3). Três ambientes apresentam condição de qualidade compatível com Classe 1, sendo considerada uma boa classe de qualidade da água, mesmo tendo apresentado estado eutrófico (Tabela 4.4). O ponto C é um canal construído

exclusivamente para a captação de água. Ele provém da Lagoa do Peixoto/Osório-RS, que é uma lagoa costeira rasa, com histórico de florações de cianobactérias anuais durante o verão, razão pela qual ele foi construído. Assim, as condições físico-químicas muitas vezes apresentam-se alteradas, como foi o caso das concentrações de oxigênio dissolvido, pois o canal possui pequena profundidade e, muitas vezes, apresenta desenvolvimento de macrófitas em toda a sua extensão.

A partir da análise qualitativa dos organismos, verificou-se que os ambientes apresentaram alta diversidade fitoplanctônica, com mais de 40 gêneros em cada um deles. Mesmo nos mananciais com ocorrência de florações de cianobactérias (B1, B4 e C), outros gêneros coexistiram com a cianobactéria dominante, no entanto, em menores densidades (Tabela 4.4). A Figura 4.2 mostrou a presença constante das cianobactérias durante todo ano, mesmo em baixas densidades, nesses mananciais. Nos demais, alguns picos de fitoplâncton foram acompanhados de picos de cianobactérias, porém, outros grupos de organismos podem elevar a densidade total. Isso pode ser observado nos mananciais B2 e B3, quando a densidade fitoplanctônica total foi elevada pelo aumento de algas verdes e diatomáceas, respectivamente.

O grupo das algas verdes apresentou maior número de representantes, em todos os ambientes, uma vez que corresponde a um grupo amplo e variado de algas, com maior diversidade de espécies, formas e tamanhos (REVIERS, 2006). Destaca-se a ocorrência de *Desmidium* e *Micrasterias*, gêneros raros e de ocorrência em águas não contaminadas (PALMER, 1962; DI BERNARDO, 1995; DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010), identificados no manancial B2.

Com relação às diatomáceas, o incremento de *Asterionella*, ocorrido no manancial B3, pode gerar odor na água e obstrução dos filtros das ETAs (PALMER, 1962; DI BERNARDO, 1995). Os fitoflagelados ocorreram em todos os mananciais, porém, sempre em baixa densidade.

Com relação ao grupo das cianobactérias, verificou-se sua ocorrência em todos os ambientes estudados. As florações detectadas nos mananciais B1, B4 e C foram dos gêneros *Planktothrix*, *Cylindrospermopsis* e *Microcystis*, respectivamente, todos apresentando espécies produtoras de toxinas. Além destes, porém, sem ocorrência de florações, foram encontrados outros gêneros potencialmente tóxicos, como *Anabaena*, *Aphanizomenon* e *Oscillatoria*. Em função disso, destaca-se a importância desse tipo de monitoramento, uma vez que possibilita a detecção dos organismos potencialmente tóxicos e permite uma rápida tomada de decisão, pela Companhia de Saneamento, quanto às alterações necessárias no processo de tratamento da água. Dentre essas alterações estão o uso de carvão ativado, a suspensão da pré-cloração e a utilização de polímero auxiliar de floculação (DI BERNARDO, 1995; DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010). De acordo com a densidade celular encontrada, torna-se necessário o aumento da frequência de monitoramento das cianobactérias, como também há necessidade de realização da análise de cianotoxinas, conforme mencionado anteriormente (BRASIL, 2004a). A identificação dos gêneros presentes permite determinar o tipo de toxina que pode ser produzido, levando a uma correta preparação da amostra para análise da cianotoxina correspondente.

Segundo Ceballos, Azevedo e Bendate (2006), as florações de cianobactérias ocorrem em ambientes de água doce neutras a alcalinas (pH de 6 a 9), com temperatura da água de 15°C a 30°C e altas concentrações de nutrientes. Os ambientes com ocorrência de floração (B1, B4 e

C) também recebem despejos orgânicos não tratados que podem elevar a concentração de nutrientes e favorecer o crescimento desses organismos. Estes mananciais possuem histórico de acompanhamento pela CORSAN superior a 30 anos, sendo as florações de cianobactérias recorrentes, nos meses mais quentes do ano. Porém, cabe ressaltar que no ponto B4, onde ocorreu à floração de maior duração e com a mais alta densidade celular entre os mananciais amostrados, a proliferação de *Cylindrospermopsis raciborskii* se manteve durante o inverno com baixas temperaturas da água (média anual de 18°C, variando de 12°C a 24°C, Tabela 4.3). A dominância desses organismos na comunidade fitoplanctônica pode ser influenciada por muitos fatores, mas é difícil determinar quais são os mais importantes, pois há sinergismo entre os fatores envolvidos (FIGUEIREDO; GIANI, 2009).

Assim, quando a água do manancial oferece riscos à saúde pública, as estações de tratamento de água devem garantir as condições mínimas para que a água possa ser destinada ao consumo humano. Com os avanços nas tecnologias de tratamento, água bruta de qualquer qualidade pode ser tratada e destinada ao abastecimento público, embora os custos e riscos envolvidos possam tornar os investimentos extremamente elevados e inviabilizar a implantação da ETA. Basicamente, há três requisitos que, simultaneamente, contribuem para que um sistema de tratamento de água seja considerado apropriado: qualidade da água bruta, tecnologia de tratamento e capacidade de sustentação (DI BERNARDO, MINILLO E DANTAS, 2010). Portanto, há necessidade de preservar os mananciais superficiais, evitando a degradação da qualidade das águas. Quanto melhor a qualidade da água bruta, menores serão os custos envolvidos no tratamento, mais simples e mais econômica será a tecnologia de tratamento empregada e menores serão os riscos à saúde pública associados a essa água.

Atualmente, são poucos os mananciais utilizados para abastecimento que tem água bruta com boa qualidade. Por isso, há importância de monitorar a comunidade fitoplanctônica com vistas às cianobactérias. Para garantir a eficácia desse monitoramento, é necessária a utilização de método de análise adequado. A confiabilidade do resultado inicia na análise qualitativa e estende-se à quantitativa. Nesse sentido, a capacitação e o treinamento dos profissionais que realizam esse tipo de análise, associado a um método de análise apropriado, garantem a confiabilidade analítica dos resultados. A classificação correta dos organismos em seus grupos é o primeiro passo para a quantificação. Se a classificação for equivocada, a quantificação não refletirá a realidade da água monitorada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. *NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2005a.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. *D4148-82: Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method*. Estados Unidos, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION APHA AWWA WEF (APHA; AWWA; WEF). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington, D.C., 2005.

ANNEVILLE, O.; SOUSSI, S.; GAMMETER, S.; STRAILE, D. Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamics in three peri-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshwater Biology*, 49, v. 1, 98-115, 2004.

BRANCO, S. M. *Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária*. 3ª Ed. São Paulo, SP: CETESB/ASCETESB, 1986. 640p.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 9.433, de 08 de janeiro de 1997: Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001,

de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Brasília: *Diário Oficial da União*, 09/01/1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004: estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília: *Diário Oficial da União*, n. 59, 26/03/2004a, p. 266-270.

CARNEIRO, C.; PEGORINI, E. S.; ANDREOLI, C. V. Introdução. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados*. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 1. p. 25-44.

CEBALLOS, B. S. O., AZEVEDO, S. M. F. O., BENDATE, M. M. A. Fundamentos Biológicos e Ecológicos Relacionados as Cianobactérias. In: PÁDUA, V. L. (Coord.) *Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, 2006. Cap. 2. p. 23-81.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. *Resolução CONAMA 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*, n. 53, p. 58-63, Mar. 2005

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. *Norma Técnica L5.303: Fitoplâncton de Água Doce - Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio)*. São Paulo, 2005.

DI BERNARDO, L. *Algas e suas Influências na Qualidade das Águas e nas Tecnologias de Tratamento*. Rio de Janeiro, RJ: ABES, 1995. 140p.

DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. B. *Florações de algas e de cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento*. São Carlos: Editora LDiBe Ltda, 2010. 536p.

ESTEVES, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. 2ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 1998. 602p.

FIGUEIREDO, C. C.; GIANI, A. Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 445: 165-174, 2001.

_____. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent Bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologica*, v. 39, 264-272, 2009.

LEGRESLEY, M.; MCDERMOTT, G. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis – haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

MARGALEF, R. *Limnologia*. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1983. 1010p.

MÜLLER, C. C.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; CYBIS, L. F. A. Validação do método de Sedgewick-Rafter para a quantificação do fitoplâncton. *Revista DAE*, 2011. No prelo.

PALMER, M. C. *Algas en los abastecimientos de agua*. Mexico: Editorial Interamericana S. A., 1962. 91 p.

REVIERS, B. *Biologia e filogenia das algas*. Tradução de Iara Maria Franceschini. Porto Alegre: Artmed, 2006. 280p.

REYNOLDS, C. S.; IRISH, A. E.; ELLIOTT, J. A. The ecological basis for simulating phytoplankton responses to environmental change (PROTECH). *Ecological Modelling*, 140, 271-291, 2001.

WETZEL, R. G. *Limnologia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. 919p.

XAVIER, C. F.; DIAS, L. N.; BRUNKOW, R. F. Eutrofização. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados*. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 8. p. 271-302.

CAPÍTULO 5: CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os ambientes aquáticos superficiais apresentam comunidade fitoplanctônica própria, variando em riqueza e composição de espécies de acordo com as características físicas, químicas e hidrológicas locais. De uma maneira geral, apresentam interesse sanitário grupos de organismos e não as espécies presentes no corpo hídrico. Dentre os grupos, as cianobactérias podem representar um perigo sério aos sistemas de abastecimento de água, pela possibilidade de liberar toxinas na água, extremamente prejudiciais ao ser humano (ver item 1.7.3.2 Caso de Caruaru). Desta forma, as estações de tratamento devem estar preparadas para inativá-las e/ou removê-las (DI BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010). Os outros grupos de organismos também causam efeitos adversos e, portanto, devem ser analisados (ver Capítulo 1, item 1.7 Fitoplâncton em ambiente de água doce).

Como a densidade de cianobactérias é um parâmetro para avaliação da potabilidade (BRASIL, 2004a) e do enquadramento das águas (CONAMA, 2005) e, também, há necessidade de averiguar os demais grupos fitoplanctônicos em virtude dos problemas que podem gerar no tratamento da água (DI BERNARDO, 1995; CODD, 2000; FUNASA, 2003; DI BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010), faz-se necessário o uso de métodos analíticos adequados ao seu monitoramento.

Ainda que sejam métodos desenvolvidos há muitos anos atrás, para cumprir a exigência de monitoramento fitoplanctônico da legislação, a melhor opção para empresas de saneamento é a utilização de métodos de microscopia. Dentre eles, há uma variedade de metodologias a serem escolhidas (ver Capítulo 1, item 1.9.3.1 Métodos de microscopia). A análise microscópica não fornece apenas a densidade celular dos organismos, também é possível saber quais os gêneros fitoplanctônicos presentes na amostra. Essa análise qualitativa torna-se fundamental no caso das cianobactérias, pois de acordo com os gêneros encontrados verifica-

se a presença ou ausência de organismos potencialmente tóxicos, identifica-se qual o tipo de toxina pode ser produzido e prepara-se a amostra para a(s) análise(s) da(s) cianotoxina (s) correspondente(s).

Uma maneira de demonstrar a competência do laboratório e avaliar o seu desempenho em ensaios específicos é a participação em programas de comparações interlaboratoriais. Nesse sentido, a participação no Programa Piloto de Ensaios de Proficiência em Cianobactérias da Rede Metrológica do Rio Grande do Sul (ver Capítulo 2), pioneiro nessa área analítica, demonstrou desempenho satisfatório. Participaram deste programa diversos laboratórios brasileiros, utilizando métodos normalizados, sendo possível delinear um panorama nacional em relação à identificação e à contagem desses organismos. Em relação à análise quantitativa, o cenário é favorável, uma vez que 80% dos laboratórios participantes apresentaram desempenho satisfatório. No entanto, a análise qualitativa mostrou-se deficiente, com muitas divergências nos gêneros identificados pelos participantes. Mais uma vez fica evidenciada a necessidade de realizar uma boa análise qualitativa.

O método utilizado neste Programa foi validado pelo Laboratório Central de Águas da Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) para análise do fitoplâncton como um todo. A validação da metodologia empregada foi uma exigência imposta pela norma NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a), item 5.4. Este item aborda a Validação de Métodos, dentre eles, métodos normalizados usados com modificação devem estar validados para uso na rotina do laboratório. O método normalizado de referência foi o método de Sedgwick-Rafter, segundo APHA, AWWA e WEF (2005) e critérios de contagem seguindo CETESB (2005). A modificação realizada foi o uso de amostras vivas em substituição às amostras preservadas do

método normalizado. Para verificar se o método assim utilizado estava adequado a finalidade proposta, foi realizado um estudo de validação, conforme dados apresentados no Capítulo 3.

Os parâmetros de garantia da qualidade analítica estabelecidos neste estudo de validação são inéditos para esse tipo de método de ensaio. A estabilidade das amostras vivas, de até 72 horas após a coleta, permite uma identificação mais adequada dos organismos. Muitas características morfológicas importantes para a diferenciação dos gêneros, como mobilidade, disposição e formato do cloroplasto, só podem ser observadas com os organismos vivos (CETESB, 2005). Desta forma, também se garante a qualidade analítica do ensaio qualitativo. Além disso, o método mostrou-se exato quando comparado com o método normalizado, evidenciando que as amostras vivas geram os mesmos resultados das amostras preservadas.

Os limites de detecção e de quantificação do método transmitem confiabilidade aos resultados, pois somente os valores obtidos com rigor metrológico, de acordo com os equipamentos e condições analíticas do laboratório, são entregues ao cliente. Valores abaixo dos limites podem representar interferência ou erro de análise, não correspondendo à realidade da amostra analisada. A determinação da incerteza de medição também é um parâmetro importante para interpretação do resultado de uma amostra. Um valor pontual não representa a realidade da amostra, pois não há um valor verdadeiro pré-determinado, isto é, não se sabe qual é o resultado esperado da amostra que está sendo analisada. Assim, existe uma dúvida remanescente ao processo de medição, em virtude das incertezas das calibrações dos materiais (vidrarias e pipetadores) e equipamentos (centrífugas e microscópios), que não são passíveis de correção. No entanto, como a maior contribuição para a incerteza de ensaios biológicos vem dos analistas, foram utilizados nos cálculos da incerteza da quantificação do fitoplâncton os estudos de repetitividade (REPE) e reprodutibilidade (REPRO) (ver Capítulo

1, item 1.10 Garantia da qualidade e confiabilidade analítica de resultados; e Capítulo 3, item Incerteza de Medição). Além disso, os dados de contagem são trabalhados na forma logarítmica (\log_{10}), não sendo possível utilizar, em um mesmo cálculo, os dados de REPE e REPRO e as incertezas dos certificados de calibração de materiais e equipamentos.

O método mostrou-se robusto, ou seja, diferentes microscópios não interferiram nos resultados da análise, nem a proteção dos frascos de coleta contra luminosidade. As diferenças dos microscópios referem-se ao modelo do equipamento e ao tipo de objetivas, mas ambos eram do tipo comum com oculares de 10x. Um dos microscópios possuía objetivas comuns (equipamento 1) e o outro, objetivas de longa distância (equipamento 2). A participação em programas de comparação interlaboratorial é mais um parâmetro que demonstra o desempenho de um laboratório através de método analítico. O método validado mostrou-se apropriado para a quantificação do grupo das cianobactérias, após participação no Programa Piloto da Rede Metroológica.

Ao método de Sedgwick-Rafter, é apontada como desvantagem a inviabilidade de observação das amostras com aumentos superiores à 200x. Como a câmara de contagem é espessa, não permite a utilização de objetivas de 40x, 60x e 100x comumente equipadas nos microscópios ópticos. No entanto, essa dificuldade pode ser solucionada com a aquisição de objetivas de longa distância, que são objetivas mais curtas, permitindo a focalização em aumentos de 40x e 60x. Assim, o aumento não fica restrito à 200x (com utilização de oculares de 10x), podendo alcançar até 600x. Associado a este método, a concentração das amostras por centrifugação permite obter resultados da análise em curto período de tempo. Os resultados podem ser obtidos no mesmo dia da coleta da amostra, e as ações que devam ser tomadas podem iniciar imediatamente.

Além dos parâmetros de qualidade analítica expostos até aqui, também são importantes as condições ambientais de trabalho. A infra-estrutura do ambiente de trabalho deve ser adequada, com mesa e cadeiras apropriadas para suportar os equipamentos e ergonômicas, uma vez que a análise microscópica muitas vezes requer que o analista gaste muitas horas sentado, observando amostras ao microscópio. A utilização de equipamentos adequados, como provetas, pipetadores, centrífugas e, principalmente, microscópio, também interferem no resultado da análise. A calibração dos materiais e dos equipamentos garante precisão dos volumes de amostra utilizados, bem como do número de células dos organismos presentes na amostra.

O Capítulo 4 mostra dados de monitoramento fitoplanctônico realizado em seis mananciais de superfície utilizados para abastecimento público utilizando o método validado. Os resultados apresentados revelam as alterações da comunidade fitoplanctônica ao longo do ano e os períodos com floração de cianobactérias, em que o tratamento da água pode requerer alterações ou até mesmo etapas complementares, como suspensão de pré-cloração e utilização de carvão ativado em pó. Os dados de cor e turbidez apresentados, com valores máximos de 200 mg.L^{-1} Pt e 73 NTU, respectivamente, não dificultam a visualização dos organismos. Estes valores são normalmente encontrados nas amostras de rotina e não são considerados interferentes nessa análise. Esse monitoramento evidencia a necessidade de uma análise qualitativa confiável e precisa. Ou seja, para quantificar corretamente os grupos fitoplanctônicos, especialmente as cianobactérias que são parâmetro de legislação, deve ser feita uma correta identificação dos organismos encontrados na amostra no seu respectivo grupo.

A correta identificação dos organismos é obtida através da capacitação dos analistas, desde a formação inicial, na área das Ciências Biológicas, bem como com treinamentos direcionados à ficologia posteriores com profissionais especialistas nos diferentes grupos de organismos. Além disso, é necessário acesso às referências bibliográficas da área, como chaves de identificação, manuais de identificação e materiais ilustrados, no local de trabalho para pronta utilização sempre que o analista sentir necessidade. Uma análise qualitativa adequada pressupõe uma análise quantitativa precisa e confiável.

Enfim, de acordo com o exposto anteriormente e devido às atividades antrópicas na bacia hidrográfica de um manancial, principalmente sistemas fechados, como lagos e reservatórios, afetarem a qualidade da água, torna-se imprescindível o seu monitoramento. Os impactos causados pelo ser humano nos mananciais dependem das atividades desenvolvidas na bacia hidrográfica, tais como desmatamento, mineração, rodovias, ferrovias, barramentos de tributários e do curso de água principal, disposição inadequada de águas residuárias domésticas e industriais (tratadas ou não), disposição imprópria de resíduos sólidos, crescimento urbano, agricultura, irrigação, recreação e turismo, navegação, poluição atmosférica, etc. Assim, a análise da comunidade fitoplanctônica visa à identificação e quantificação dos organismos presentes na água. Quando feitas regularmente, estas análises constituem elemento auxiliar na interpretação de outras análises, principalmente no que se refere à poluição das águas, e possibilitam a adoção de medidas de controle para prevenir o desenvolvimento de organismos indesejáveis do ponto de vista do tratamento de água (DI BERNARDO; MINILLO; DANTAS, 2010).

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. *Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais*. Guia Prático. Porto Alegre, RS: Rede Metrológica RS, 2009. 136p.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. *D4148-82: Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method*. Estados Unidos, 2004.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION APHA AWWA WEF (APHA; AWWA; WEF). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21 ed. Washington, D.C., 2005.

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. – AWWA; USP. *Processos simplificados para exame e análise da água* (AWWA manual simplificado para laboratório, M12). São Paulo: Universidade de São Paulo; 1970. 276 p.

ANNEVILLE, O.; SOUSSI, S.; GAMMETER, S.; STRAILE, D. Seasonal and inter-annual scales of variability in phytoplankton assemblages: comparison of phytoplankton dynamics in three peri-alpine lakes over a period of 28 years. *Freshwater Biology*, 49, v. 1, 98-115, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. *NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração*. Rio de Janeiro, 2005a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. *NBR ISO 9000: Sistema de gestão da qualidade – Fundamentos e vocabulário*. Rio de Janeiro, 2005b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR ISO/IEC Guia 43-1:1999: ensaios de proficiência por comparações interlaboratoriais - Parte 1: desenvolvimento e operação de programas de ensaios de proficiência*. Rio de Janeiro: ABNT, 2005c.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. *NBR ISO 9001: Sistemas de gestão da qualidade - Requisitos*. Rio de Janeiro, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (ABNT; INMETRO). *Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM)*. 3 Ed. Rio de Janeiro, 2003.

ASSOCIAÇÃO REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). *Metrologia: A base física da qualidade*. CD-ROM, Rede Metrológica do Rio Grande do Sul, 2003.

ASSOCIAÇÃO REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). *RM68 – Incerteza de medição: guia prático do avaliador de laboratórios*. Revisão 03. Porto Alegre, 2009.

ASSOCIAÇÃO REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). *Programa Piloto de Ensaios de Proficiência em Cianobactérias: relatório de 2010*. Porto Alegre: RMRS, 2010.

AUTOMOTIVE INDUSTRY ACTION GROUP (AIAG). *Measurement Systems Analysis*. 3. Ed. Detroit: Chrysler Corporation, Ford Motor Company and General Motors Corporation, 2002.

AVILA, I.R.; TORGAN, L.C.; MALTCHIK, L. Composição da microflora de uma lagoa associada à planície de inundação do rio dos Sinos, RS. *Pesquisas, Botânica*, n. 52, p. 167-183, 2002.

AZEVEDO, S. M. F. O. *et al.* Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru – Brazil. *Toxicology*, n. 181-182, p. 441-446, 2002.

BENETTI, A. D.; DE LUCCA, S. J.; CYBIS, L.F. Remoção de Gosto e Odor em Processos de Tratamento de Água. In: PÁDUA, V. L. (Coord.) *Remoção de microorganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano*. Rio de Janeiro: ABES, 2009. Cap. 8. p. 292-326.

BEUTLER, M. *et al.* A fluorometric method for the differentiation of algal populations *in vivo* and *in situ*. *Photosynthesis Research*, n. 72, p. 39-53, 2002.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições*. 2ª Ed. São Carlos, SP: RIMA, 2006. 502p.

BOLLMANN, H. A.; CARNEIRO, C.; PEGORINI, E. S. Qualidade da Água e Dinâmica de Nutrientes. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados*. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 7. p. 213-270.

BRANCO, S. M. *Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária*. 3ª Ed. São Paulo, SP: CETESB/ASCETESB, 1986. 640p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 1990: Aprova normas e o padrão de Potabilidade da Água destinada ao consumo humano. Brasília: *Diário Oficial da União*, 23/01/1990.

BRASIL. Casa Civil. Lei nº 9.433, de 08 de janeiro de 1997: Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Brasília: *Diário Oficial da União*, 09/01/1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000: Aprova a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano, que dispõe sobre procedimentos e responsabilidades inerentes ao controle e à vigilância da qualidade da água para consumo humano, estabelece o padrão de potabilidade da água para consumo humano, e dá outras providências. Brasília: *Diário Oficial da União*, 10/01/2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004: estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Brasília: *Diário Oficial da União*, n. 59, 26/03/2004a, p. 266-270.

BRASIL, C. P. *Avaliação da Remoção de Microcistina em Água de Abastecimento Público por Diferentes Carvões Ativados em Pó Produzidos no Brasil*. 2004. 114 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2004b.

BRUCE, P.; MINKKINEN, P.; RIEKKOLA, M. L. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochimica Acta*. N. 128, p. 93-106. 1998.

CANADIAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION INC. (CALA). *Measurement Uncertainty Policy*. P19, Revision 1.10, 2010.

CARNEIRO, C.; PEGORINI, E. S.; ANDREOLI, C. V. Introdução. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados*. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 1. p. 25-44.

CEBALLOS, B. S. O.; AZEVEDO, S. M. F. O.; BENDATE, M. M. A. Fundamentos Biológicos e Ecológicos Relacionados as Cianobactérias. In: PÁDUA, V. L. (Coord.)

Contribuição ao estudo da remoção de cianobactérias e microcontaminantes orgânicos por meio de técnicas de tratamento de água para consumo humano. Rio de Janeiro: ABES, 2006. Cap. 2. p. 23-81.

CELLAMARE, M.; ROLLAND, A.; JACQUET, S. Flow cytometry sorting of freshwater phytoplankton. *Journal of Applied Phycology*, v. 22, p. 87-100, 2010.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. *Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: Spon E & EN, 1999.

CHOW, C. W. K. *et al.* The impact of conventional water treatment processes on cell of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Water Research*, v. 33, n. 15, p. 3253-3262, 1999.

CODD, G. A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecological Engineering*, v. 16, p.51-60, 2000.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. *Norma Técnica L5.303: Fitoplâncton de Água Doce - Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio)*. São Paulo, 2005.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. *Resolução CONAMA 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*, n. 53, p. 58-63, Mar. 2005

COTNER, J. B.; BIDDANDA, B. A. Small players, large role: microbial influence on biogeochemical processes in pelagic aquatic ecosystems. *Ecosystems*, v. 5, p. 105-121, 2002.

CULVERHOUSE, P. F. *et al.* Do experts make mistakes? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series*, v. 247, p. 17-25, 2003.

CYBIS, L. F. A. *et al.* *Manual para estudo de cianobactérias planctônicas em mananciais de abastecimento público: Caso da Represa Lomba do Sabão e Lago Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul*. Rio de Janeiro: ABES, 2006. 64p.

DI BERNARDO, L. *Algas e suas Influências na Qualidade das Águas e nas Tecnologias de Tratamento*. Rio de Janeiro, RJ: ABES, 1995. 140p.

DI BERNARDO, L.; MINILLO, A.; DANTAS, A. D. B. *Florações de algas e de cianobactérias: suas influências na qualidade da água e nas tecnologias de tratamento*. São Carlos: Editora LDiBe Ltda, 2010. 536p.

DIERCKX, S.; METFIES, K.; MEDLIN, L. Electrochemical detection of toxic algae with a biosensor. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

DUBELAAR, G. B. J. *et al.* Design and First Results of CytoBuoy: A Wireless Flow Cytometer for In Situ Analysis of Marine and Fresh Waters. *Cytometry*, v. 37, p. 247-254, 1999.

DUBELAAR, G. B. J.; GERRITZEN, P. L. CytoBuoy: a step forward towards using flow cytometry in operational oceanography. *Scientia Marina*, v. 64, n. 2, p. 255-265, 2000.

DUSSART, B.H. Les différentes catégories de plancton. *Hydrobiologia*, v. 26, p. 72-74, 1965.

EDLER, L.; ELBRÄCHTER, M. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

EMBLETON, K. V.; GIBSON, C. E.; HEANEY, S. I. Automated counting of phytoplankton by pattern recognition: a comparison with a manual counting method. *Journal of Plankton Research*, v. 25, n. 6, p. 669-681, 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. *LG401: Standard Operating Procedure for Phytoplankton Analysis*. Revision 4. Estados Unidos, 2007.

ESTEVEZ, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. 2ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 1998. 602p.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION – CEN. *EN 15204: Water Quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)*. União Européia, 2006.

FALCONER, I. *et al.* Safe levels and safe practices. In: *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Published on behalf of WHO – World Health Organization by Taylor and Francis. London & New York, 1999. 416p.

FIGUEIREDO, C. C.; GIANI, A. Seasonal variation in the diversity and species richness of phytoplankton in a tropical eutrophic reservoir. *Hydrobiologia*, 445: 165-174, 2001.

_____. Phytoplankton community in the tropical lake of Lagoa Santa (Brazil): Conditions favoring a persistent Bloom of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Limnologia*, v. 39, 264-272, 2009.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIS ROESSLER – FEPAM. *Portaria n° 035, de 03 de agosto de 2009*: dispõe sobre normas para Cadastramento de Laboratórios de Análises Ambientais junto à FEPAM. Porto Alegre, 2009.

FRANQUEIRA, D. *et al.* Potencial use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *The Science of the Total Environment*, v. 247, p. 119-126, 2000.

GAEVSKY, N. A. *et al.* Using DCMU-fluorescence method for the identification of dominant phytoplankton groups. *Journal of Applied Phycology*, v. 17, p. 483-494, 2005.

GALLUZZI, L.; PENNA, A. Quantitative PCR for detection and enumeration of phytoplankton. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

GESCHER, C.; METFIES, K.; MEDLIN, L.K. Hybridisation and microarray fluorescent detection of phytoplankton. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

GOHDE, A. *et al.* Intercalibration of classical and molecular techniques for identification of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) and estimation of cell densities. *Harmful Algae*, v. 6, p. 56-72, 2007.

GOSSELAIN, V.; HAMILTON, P. B. Algamica: revisions to a key-based computerized counting program for free-living, attached, and benthic algae. *Hydrobiologia*, v. 438, p. 139-142, 2000.

GOSSELAIN, V.; HAMILTON, P. B.; DESCY, J. P. Estimating phytoplankton carbon from microscopic counts: an application for riverine systems. *Hydrobiologia*, v. 438, p. 75-90, 2000.

GREGOR, J. *et al.* *In situ* quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia*, n. 548, p. 141-151, 2005.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll *a*: a comparative study of *in vitro*, *in vivo* and *in situ* methods. *Water Research*, v. 38, p. 517-522, 2004.

HAIDER, S. *et al.* Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere*, v. 52, p. 1-21, 2003.

HAWKINS, P. R. *et al.* Change in cyanobacterial biovolume due to preservation by Lugol's Iodine. *Harmful Algae*, v. 4, 1033-1043, 2005.

HILLEBRAND, H. *et al.* Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*, v. 35, p. 403-424, 1999.

HENSE, B. A. Use of fluorescence information for automated phytoplankton investigation by image analysis. *Journal of Plankton Research*, v. 30, n. 5. p. 587-606, 2008.

HOEGER, S. J. *et al.* Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in two Australian drinking water treatment plants. *Toxicon*, v. 43, p. 639-649, 2004.

INFANTE, A. G. *El plancton de las aguas continentales*. Washington, D.C.: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 1988. 126p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. *Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos*. DOQ-CGCRE-008: Revisão 03. 2010. Disponível em: www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2010.

INTERNATIONAL LABORATORY ACCREDITATION COOPERATION (ILAC). *ILAC-G13:08 - Guidelines for the Requirements for the Competence of Providers of Proficiency Testing Schemes*. ILAC: Austrália, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. *ISO 10260. Water quality – Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*. Switzerland, 1992.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*. Geneva: ISO, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). *ISO 19458: Water quality – Sampling for microbiological analysis*. Suíça, 2006a.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION / TECHNICAL REPORT (ISO/TR). *ISO/TR 13843: Water quality – Guidance on validation of microbiological methods*. Suíça, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION / TECHNICAL SPECIFICATION (ISO/TS). *ISO/TS 19036: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines of the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations*. Suíça, 2006b.

JOCHIMSEN, E. M. *et al.* Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *The New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 13, p. 873-878, 1998.

KARLSON, B. *et al.* Introduction to methods for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris, 2010.

KOMÁREK, J.; ANAGNOSTIDIS, K. Cyanoprokaryota. 1. Teil: Chroococcales. In: PASCHER, A. (Ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1998, p. 192-224.

KOMÁREK, J.; KLING, H. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). *Algological Studies*, v. 61, p. 21-45, 1991.

KURODA, E. K. *et al.* Caracterização e escolha do tipo de carvão ativado a ser empregado no tratamento de águas contendo microcistinas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 23, 2005, Campo Grande, MS. [*Anais eletrônicos...*] Campo Grande: ABES, 2005. CD-ROM.

LAMBERT, T. W.; HOLMES, C. F. B.; HRUDEY, S. E. Adsorption of microcystin-LR by activated carbon and removal in full scale water treatment. *Water Research*, v. 30, n. 6, p. 1411-1422, 1996.

LARSON, C.; PASSY, S. I. Spectral fingerprinting of algal communities: a novel approach to biofilm analysis and biomonitoring. *Journal of Phycology*, v. 41, p. 439-446, 2005.

LAWTON, L.; MARSALEK, B.; PADISÁK, J.; CHORUS, I. Determination of cyanobacteria in the laboratory. In: *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Published on behalf of WHO – World Health Organization by Taylor and Francis. London & New York, 1999. 416p.

LEBOULANGER, C. *et al.* Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 30, p. 83-99, 2002.

LEGRESLEY, M.; MCDERMOTT, G. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis – haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; LECREN, E. D. The inverted microscope method of estimating algal number at the statistical basis of estimating by counting. *Hydrobiologia*, v. 11, p. 143-170, 1958.

MACEDO, A.; MARINO, L. *O microscópio de epifluorescência como auxiliar na identificação de cianobactérias*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 24, Anais... Belo Horizonte: ABES, I-176, 2007.

MARGALEF, R. *Limnologia*. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1983. 1010p.

MARRIN III, R.; SCHOLIN, C. A. Toxic algal detection using rRNA-targeted probes in a semi-automated sandwich hybridization format. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

MCDERMOTT, G.; RAINE, R. Settlement bottle method for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, n° 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

MEASUREMENT SYSTEMS ANALYSIS (MSA). Manual de análise de sistemas de medição. 4ª Ed. 2010. Disponível em: <www.portallaction.com.br>. Acesso em: 28 de abril de 2011.

MELO, S.; REBELO, S.R.M.; SOUZA, K.F.; MENEZES, M.; TORGAN, L.C. Diversidade Biológica – Fitoplâncton. In: Silva te AL (Editores) *Biotupé: meio físico, diversidade biológica e sociocultural do baixo rio Negro, Amazônia Central*. Manaus: INPA. 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE. *Cianobactérias Tóxicas na Água para Consumo Humano. Impactos na Saúde Pública e Processos de Remoção em Água para Consumo Humano*. FUNASA/MS, Brasília, Brasil, 2003. 56p.

MOTA, S. *Introdução à Engenharia Ambiental*. 3ª Edição. Rio de Janeiro: ABES, 2003. 416p.

MÜLLER, C. C. *Avaliação da utilização de carvão ativado em pó na remoção de microcistina em água para abastecimento público*. 2008. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

MÜLLER, C. C.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; CYBIS, L. F. Adsorção em carvão ativado em pó para remoção de microcistina de água de abastecimento público. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 14(1): 29-38, 2009.

MÜLLER, C. C.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; CYBIS, L. F. A. Validação do método de Sedgwick-Rafter para a quantificação do fitoplâncton. *Revista DAE*, 2011. No prelo.

MUR, L. R.; SKULBERG, O. M.; ULKILEN, H. Cyanobacteria in the environment. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.) *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. London: E & FN Spon, 1999. Cap. 2. p. 15-40.

NAUWERK, A. Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im See Erken. *Sym. Bot. Upsal.*, v. 17 (5), 1963.

OLSON, R. J.; SHALAPYONOK, A.; SOSIK, H. J. An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep-Sea Research – Part I*, v. 50, p. 301-315, 2003.

OLSON, R. J.; SOSIK, H. M. A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano- and microplankton: Imaging FlowCytobot. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 5, p. 195-203, 2007.

OMS. *Guidelines for Drinking-water Quality. Health Criteria and Other Supporting Information*. 2 Ed. Adendo ao v. 2. Organização Mundial de Saúde, Genebra, 1998.

PALMER, M. C. *Algas en los abastecimientos de agua*. Mexico: Editorial Interamericana S. A., 1962. 91 p.

PARÉSYS, G. *et al.* Quantitative and qualitative evaluation of phytoplankton communities by trichromatic chlorophyll fluorescence excitation with special focus on cianobactéria. *Water Research*, v. 39, p. 911-921, 2005.

POULTON, N. J.; MARTIN, J. L. Imaging flow cytometry for quantitative phytoplankton analysis – FlowCAM. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia Vegetal*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1996.

REVIERS, B. *Biologia e filogenia das algas*. Tradução de Iara Maria Franceschini. Porto Alegre: Artmed, 2006. 280p.

REYNOLDS, C. S.; IRISH, A. E.; ELLIOTT, J. A. The ecological basis for simulating phytoplankton responses to environmental change (PROTECH). *Ecological Modelling*, 140, 271-291, 2001.

RODENACKER, K. *et al.* Automatic Analysis of Aqueous Specimens for Phytoplankton Structure Recognition and Population Estimation. *Microscopy Research and Technique*, v. 69, p. 708-720, 2006.

ROTT, E.; SALMASO, N.; HOEHN, E. Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates – an easy task or a Gordian knot? *Hydrobiologia*, v. 578, p. 141-146, 2007.

ROUND, F. E. *Biologia das Algas*. 2ª Ed. Tradução de Francisco Pelegrino Neto. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983. 263 p.

SANT'ANNA, C. L. *et al.* *Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras*. Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006, 58p.

SIERACKI, C. K.; SIERACKI, M. E.; YENTSCH, C. S. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Marine Ecology Progress Series*, v. 168, p. 285-296, 1998.

SIVONEN, K., JONES, G. Cyanobacterial toxins. In: *Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management*. Published on behalf of WHO – World Health Organization by Taylor and Francis. London & New York, 1999. Cap. 3. p. 41 – 112.

SOSIK, H. M. *et al.* Growth rates of coastal phytoplankton from time-series measurements with a submersible flow cytometer. *Limnology and Oceanography*, v. 48, n. 5, p. 1756-1765, 2003.

SOSIK, H. M.; OLSON, R. J. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 5, p. 204-216, 2007.

THYSSEN, M. *et al.* The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *Journal of Plankton Research*, v. 30, n. 3, p. 333-343, 2008.

TÖBE, K. *et al.* Detecting intact algal cells with whole cell hybridization assays. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

TORGAN, L.C.; AGUIAR, L.W. Diatomáceas do "Rio" Guaíba, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. *Iheringia*. v. 23, p. 19-63, 1978.

ÜTERMOHL, H. Zur Vervollkommung der Quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, v. 9, p. 1-38, 1958.

VAN DER HOEK, C.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. *Algae – An Introduction to Phycology*. USA: Cambridge University Press, 1995. 623p.

VUORIO, K.; LEPISTÖ, L.; HOLOPAINEN, A.L. Intercalibrations of freshwater phytoplankton analyses. *Boreal Environment Research*, v. 12, n. 5, p. 561-570, 2007.

WEHR, J. D.; SHEATH, R. G. *Freshwater algae of North America – Ecology and Classification*. USA: Academic Press, 2003. 918p.

WEISSE, T. Biodiversity of freshwater microorganisms – achievements, problems, and perspectives. *Polish Journal of Ecology*, v. 54, n. 4, p. 633-652, 2006.

WERNER, V.R. *Cyanophyceae/Cyanobacteria no sistema de lagoas e lagoas da Planície Costeira do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 2002.

WETZEL, R. G. *Limnologia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. 919p.

WHITTON, B. A.; POTTS, M. Introduction to the cyanobacteria. In: WHITTON, B. A.; POTTS, M. (Editors) *The Ecology of Cyanobacteria – Their Diversity in time and space*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 1. p. 1-11.

WILLEN, E. A simplified method of phytoplankton counting. *Br. Phycol. J.*, v. 11, p. 265-278, 1976.

WOELKERLING, W. J.; KOWAL, R. R.; GOUGH, S. B. Sedgwick-Rafter cell counts: a procedural analysis. *Hydrobiologia*, v. 48, n. 2, p. 95-107, 1976.

XAVIER, C. F.; DIAS, L. N.; BRUNKOW, R. F. Eutrofização. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados*. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 8. p. 271-302.