

CONSIDERAÇÕES SOBRE METODOLOGIAS DE CONTAGEM DE ALGAS DO PERIFÍTON**BICUDO, D.C.*****RESUMO**

Este trabalho é uma síntese dos métodos mais usualmente empregados na contagem de algas do perifíton. Inclui métodos "in situ" e do material removido do substrato, bem como técnicas de separação. São feitas algumas considerações sobre as vantagens e desvantagens dos métodos, sobre fixação do material em função da metodologia de quantificação e sobre a determinação de limites de contagem. Finalmente, algumas sugestões gerais são apresentadas no sentido de, na medida do possível, minorar certas desuniformidades e/ou nortear os estudos quantitativos dessa comunidade.

ABSTRACT - SOME CONSIDERATIONS ON THE ENUMERATION METHODS FOR PERIPHYTIC ALGAE

This article synthesizes the most common methods for the enumeration of periphytic algae. It includes "in situ" and removal methods, as well as separation techniques. Considerations both for and against each

* IBt - São Paulo, SP

method, on the fixation of the material in relation to the quantitative procedure adopted, and on the establishment of an enumeration limit are presented. Finally, a few general suggestions are, as far as possible, presented aiming at decreasing of certain unevennesses and/or guiding of the quantitative studies of the periphytic community.

INTRODUÇÃO

Em oposição à metodologia de contagem de comunidades fitoplanctônicas, raros são os trabalhos que fazem uma avaliação crítica das fontes e da magnitude de erros dos métodos empregados no estudo das comunidades de algas do perifíton. E esta situação é particularmente agravada pela existência de inúmeros métodos diferentes na quantificação desta comunidade.

SLÁDECKOVÁ (1962) já havia salientado a importância, para a limnologia em geral, de trabalhos estatísticos comparativos sobre as distintas metodologias. Entretanto, muito pouco foi feito neste sentido e novos métodos continuaram a ser propostos, ainda recentemente.

Esta situação atual é fruto da história relativamente recente dos estudos sobre perifíton em relação à do fitoplâncton e, principalmente, dos vários problemas inerentes à análise de uma comunidade tão complexa e heterogênea.

Uma revisão mais ampla sobre a metodologia empregada no estudo do perifíton foi feita por SLÁDECKOVÁ (1962). Mais recentemente, DELBECQUE (1985) fez uma avaliação de determinados métodos e técnicas de remoção com base no estudo do perifíton de *Nuphar lutea* (L.) Smith e *Nymphaea alba* L. Apesar dos trabalhos acima, informações importantes e específicas sobre a contagem desta comunidade encontram-se dispersas em literatura, ou não-publicadas. Este fato, juntamente com a inexistência de bibliografia

nacional no assunto, levaram à realização deste trabalho. Devido à amplitude do tema, pretende-se apresentar apenas os métodos que vêm sendo mais usualmente empregados no estudo das algas do perifíton, com os seus problemas, vantagens e desvantagens. Fogem do presente objetivo as questões relacionadas com os procedimentos de coleta e amostragem.

OBSERVAÇÃO DO MATERIAL

Já de início, o primeiro problema reside na observação de uma comunidade que se desenvolve sobre substratos tão heterogêneos, de diferentes espessuras e áreas, vivos e inertes. Duas possibilidades existem, dependendo das condições particulares: o exame "in situ" do material, diretamente sobre o substrato, ou após sua remoção.

MÉTODOS "IN SITU"

O exame "in situ" tem a vantagem de assegurar a observação de toda a comunidade com um mínimo de perdas, bem como a análise da microdistribuição original das algas. Este tipo de informação é, muitas vezes, necessária pois reflete a relação das algas com o substrato, principalmente tratando-se de substratos vivos (GODWARD, 1934; CATTANEO, 1978).

A quantificação diretamente sobre o substrato pode ser feita através de microscópio óptico comum, microscópio de fluorescência e microscópio eletrônico de varredura.

A eficiência destas técnicas vai depender do grau de desenvolvimento do perifíton, que pode impedir a visualização das camadas mais inferiores da comunidade. Ainda, para o exame ao microscópio comum, há outro requisito básico: o substrato deve possuir certa

transparência para permitir a passagem da luz do microscópio.

As condições para a contagem ao microscópio comum podem ser conseguidas com o uso de certos tipos de substratos artificiais tais como de lâminas de vidro, e mesmo de hospedeiros menores ou de partes deles.

Quando a aglomeração dos organismos e/ou do depósito orgânico e inorgânico do perifíton dificultam a visualização, pode-se empregar técnicas adicionais de clareamento.

Bons resultados já foram obtidos através da imersão de hospedeiros como *Lemma* e *Spirodella* em formalina a 3% durante um ou mais dias (BOWKER & DENNY, 1980; AGUJARO, comunicação pessoal); ou utilizando-se cloralhidrato para a extração de clorofila (REHBRON apud SLÁDECKOVÁ, 1962), ou clorox em combinação com lugol, como corante (CARTER, 1982); ou pré-tratamento com EDTA (DELBECQUE, 1985).

O método do microscópio de fluorescência baseia-se na fluorescência primária da clorofila a. Uma avaliação do mesmo foi feita por JONES (1974), que observou que a combinação de diferentes filtros e a imersão de pedras em solução especial possibilitavam a distinção dos vários grupos de algas. E que o método fornece estimativas rápidas e confiáveis da densidade e da microdistribuição de algas epilíticas. Entretanto, para tecido foliar, DELBECQUE (1985) só pôde distinguir a nível específico as algas maiores, de contorno característico como, por exemplo, o de *Cocconeis*, devido à fluorescência das bactérias. Assim, recomenda o método apenas para o estudo de determinadas espécies.

O microscópio eletrônico de varredura tem sido mais utilizado para o estudo da arquitetura do perifíton, devido ao seu poder de resolução e à sua profundidade de campo.

MÉTODOS BASEADOS NA REMOÇÃO

Como muitas vezes os métodos "in situ" não são viáveis, principalmente nos substratos densamente revestidos, muita atenção vem sendo dada às técnicas de separação. Todavia, a remoção do perifíton continua sendo um dos maiores obstáculos para as medidas quantitativas desta comunidade. Em parte, este problema deve-se à grande variação na textura, morfologia e topografia dos substratos; e, noutra parte, aos diferentes mecanismos e graus de fixação exibidos pelas algas perifíticas (HO, 1979).

Com a remoção, as algas mais frágeis, bem como as filamentosas, coloniais e agregadas, podem ser danificadas, além de, na maioria dos procedimentos, perder-se a configuração original do perifíton. Mas, a maior crítica é que dificilmente a separação é completa, podendo levar a dados quantitativos imprecisos. E por conta disto, muitas técnicas continuam sendo propostas ainda recentemente.

As técnicas de separação mecânica consistem, basicamente, de simples agitação (MOSS, 1976); jatos de água (HICKMAN & KLARER, 1973); várias formas de raspagem com escova, pincel, espátula de metal, entre outras (BOWKER & DENNY, 1983); e de tratamento por ultrassom (HICKMAN apud ROBINSON, 1983).

Uma combinação entre as técnicas de separação mecânica e química consiste na agitação com FAA (HO, 1979; GONS, 1982).

As técnicas de separação química estão baseadas na hidrólise ácida das algas ligadas ao substrato por substâncias mucopolissacarídeas. Enzimas como celulase, pectinase, mutanase, entre outras, e substâncias quelantes como o EDTA também podem agir nestas ligações (DELBECQUE, 1985).

Uma técnica denominada "stomaching" foi proposta

recentemente por BOWKER et alii (1986). Consiste na colocação da amostra dentro de uma bolsa plástica, que é inserida em uma máquina, onde é vigorosamente batida em sua superfície externa por pás de metal. Segundo os autores, nesta técnica o hospedeiro - *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. - permanece relativamente intacto e a suspensão obtida de algas é passível de quantificação.

Finalmente, deve-se mencionar a técnica de remoção pelo filme superficial, que é totalmente distinta das demais. É a única em que a posição mútua dos elementos do perifíton e a impressão do substrato são mantidas. O princípio desta técnica consiste na solidificação de uma substância líquida sobre o substrato, após o que ela é puxada, obtendo-se uma película translúcida juntamente com o perifíton aderido.

Substâncias como máscara facial (CATTANEO, 1978; CATTANEO & KALFF, 1978); "Cyclon-lac" (DELBECQUE, 1985); entre outras, têm sido utilizadas. Pode-se, ainda, aplicar um pré-tratamento com EDTA para facilitar o desprendimento das algas mais firmemente aderidas (DELBECQUE, 1985).

Obviamente, pela técnica do filme superficial também há o inconveniente da visualização de uma comunidade densamente desenvolvida. Todavia, tem a vantagem de possibilitar o estudo da configuração original do perifíton mesmo em substratos espessos, onde há impedimento da passagem da luz. Além disso, é muito útil para estudos específicos da parte da comunidade mais firmemente aderida, o que pode ser feito após remoção por agitação do perifíton mais frouxamente aderido (CATTANEO, 1978).

Sobre a eficiência das técnicas de separação, existem dados conflitantes em literatura e raros são os trabalhos que fazem uma abordagem comparativa entre as diferentes técnicas.

Através da agitação manual combinada com FAA, há dados de 98% de remoção (GOUGH & WOELKERLING, 1976) e de apenas 6 a 68% (CATTANEO & KALFF, 1980) para macrófitas

aquáticas.

Ainda, para *Cladophora glomerata* L. Kütz. foi observada remoção de 12 a 36% pela técnica acima e de 100% pela de "stomaching" (BOWKER et alii, 1986).

Com relação à técnica do filme superficial, CATTANEO (1978) observou a não-remoção de apenas 5% das epífitas firmemente aderidas.

Uma abordagem comparativa mais ampla destas técnicas foi feita por DELBECQUE (1985). O autor considerou que a do filme superficial pode ser usada em combinação com outras, mas que dependendo da estrutura foliar do hospedeiro a remoção não é completa; que as enzimas não facilitam a remoção principalmente das espécies prostradas; e que a capacidade do EDTA de remover a matriz não-viva do agregado de detritos do perifíton é superior à das enzimas e da agitação com FAA, com os melhores resultados obtidos em pH baixo (pH = 4,7).

No caso particular da remoção do perifíton de *Cladophora glomerata* L. Kütz., BOWKER et alii (1986) recomendam a técnica do "stomaching" como a mais rápida e eficiente.

Resultado interessante foi obtido por JONES (1974), que conseguiu remoção de 100% para uma espécie de diatomácea apilítica pelos procedimentos usuais de raspagem. Apesar da remoção total, obteve dados quantitativos subestimados com relação aos da conatem "in situ" por epifluorescência, devido ao tratamento posterior à remoção que provocou quebra das frústulas.

MÉTODOS DE CONTAGEM

Grande desuniformidade existe na metodologia de contagem. Diferenças básicas devem-se, principalmente, à quantificação do material "in situ" ou removido do substrato. Mas, mesmo em cada uma destas situações não se

está dando o mesmo tratamento.

Na contagem do perifíton removido, três métodos desenvolvidos para o estudo de comunidades fitoplanctônicas estão sendo empregados, que são os de McNABB (1960), onde a concentração e a quantificação são feitas na membrana-filtro de "Millipore" (BROWN & AUSTIN, 1971; HO, 1979); o de Segdwick-Rafter (GOUGH & WOELKERLING, 1976); e o de Utermöhl, através de microscópio invertido (CATTANEO, 1987).

A quantificação do material "in situ", bem como a do removido pela técnica do filme superficial, tem sido feita, basicamente, ao microscópio óptico comum. No primeiro caso, o hospedeiro ou parte dele pode ser colocado entre lâmina e lamínula, juntamente com a solução preservativa (AGUJARO, comunicação pessoal) ou com o fixador e mais algumas gotas de glicerol a 98% (BOWKER & DENNY, 1980). Ainda, conforme o tipo de substrato, um dos lados pode ser raspado e o outro examinado sob lamínula (SLÁDECKOVÁ, 1962). No segundo caso, o filme transparente embebido com o perifíton é montado em Permount, entre lâmina e lamínula (CATTANEO, 1978).

Lâminas semi-permanentes podem ser preparadas com o material "in situ", selando-se a lamínula com esmalte de unha ou bálsamo do Canadá, o que possibilita o re-estudo taxonômico e mesmo quantitativo do material.

Finalmente, microscópio de fluorescência tem sido mais utilizado na quantificação "in situ" de perifíton sobre pedras (JONES, 1974).

O aumento recomendado para a contagem do material ao microscópio comum, principalmente pelos métodos "in situ", é de pelo menos 1000X. Este aumento permite a visualização da parte da comunidade mais firmemente aderida, que é dificultada pelo substrato ao fundo e pelos detritos orgânicos e inorgânicos do perifíton.

O sistema de contagem do material removido ou diretamente sobre o substrato tem sido feito principalmente

por transectos ou por campos aleatórios.

UEHLINGER (1964) e SANDGREN & ROBINSON (1984) realizaram estudos estatísticos sobre a enumeração do fitoplâncton pelo método de Utermöhl. Ambos recomendam, enfaticamente, a contagem pelo sistema de campos aleatórios, em especial pelo freqüente padrão de distribuição não ao acaso das algas no sedimento destas câmaras circulares. E mesmo para distribuição ao acaso, UEHLINGER (1964) observou que este sistema de contagem fornece valores mais próximos da densidade real da câmara.

Especial atenção deve ser dada a esta recomendação na quantificação do perifíton, principalmente pelos métodos "in situ". É sabido que as algas perifíticas raramente estão distribuídas ao acaso, especialmente em densidades populacionais maiores, onde a agregação é inevitável (HO, 1979).

O tipo de distribuição das algas é também importante na determinação do número mínimo de indivíduos a ser contado ou da área mínima do substrato a ser amostrada, para se obter estimativas confiáveis.

Os autores que utilizam os métodos usuais para o fitoplâncton adotam, na maioria, as mesmas recomendações para o perifíton, ou seja, contagem de 30 campos aleatórios na membrana-filtro, conforme método da presença/ausência de McNABB (1960); e de até 100 indivíduos da espécie mais comum, pelo método de Utermöhl (LUND et alii, 1958). Entretanto, a precisão destes métodos é função da distribuição aleatória dos indivíduos na membrana ou no sedimento da câmara, o que deve ser devidamente testado (Ver HO, 1979; BROWN & AUSTIN, 1971).

A determinação do limite de contagem pelos métodos "in situ" tem sido mais problemática e, com poucas exceções, sem um estudo preliminar. Alguns baseiam-se em um número mínimo de indivíduos (BROWN, 1976), mas a maioria numa área mínima (JONES, 1974; CATTANEO, 1978; BOWKER & DENNY, 1980).

Embora mais empíricos, existem dois métodos simples e extremamente práticos para a determinação da área mínima e que podem ser aplicados para todos os métodos de contagem, independente da remoção ou não do material. O primeiro baseia-se na menor flutuação da média cumulativa calculada a cada campo ou de cinco em cinco campos aleatórios (ELLIOT, 1977). O outro, recomendado por BOUDORESQUE (1971) para estudos de fitobento marinho, consiste no método gráfico da área por espécies adicionadas. A área mínima é determinada assim que praticamente cesse a adição de espécies com o aumento da área examinada. Segundo CAIN & CASTRO apud BOUDORESQUE, (1971), esta área é atingida quando um aumento de 10% de área corresponder a um aumento inferior a 10% de espécies adicionadas. Nas Fig. 1 e 2, os métodos são respectivamente exemplificados com base em uma comunidade de algas epífitas sobre escamas de *Ricciocarpos natans* (L.) Corda. Ambos os métodos podem também ser utilizados conjuntamente e é interessante notar que fornecem resultados semelhantes. Nos exemplos, a estabilização mais rápida ocorreu nas escamas mais jovens e o oposto deu-se com as mais velhas; e a partir da amostragem de um número próximo de campos.

Finalmente, os dados quantitativos podem ser expressos em termos de indivíduos, área ou volume celular, dependendo do propósito do trabalho. ROBINSON (1983) menciona que, nem sempre, as medidas de biovolume são indicadoras precisas da biomassa e que, para algas epífitas, a área superficial celular está melhor correlacionada com taxas de assimilação.

Decidida a unidade quantitativa, os resultados podem ser expressos em peso seco ou em área superficial do substrato. Embora o primeiro possa ser mais fácil e precisamente determinado, seu uso é extremamente limitado e problemático na comparação de densidades de populações perifíticas. Isto porque a relação entre a área superficial e o peso seco é extremamente variável de macrófita para

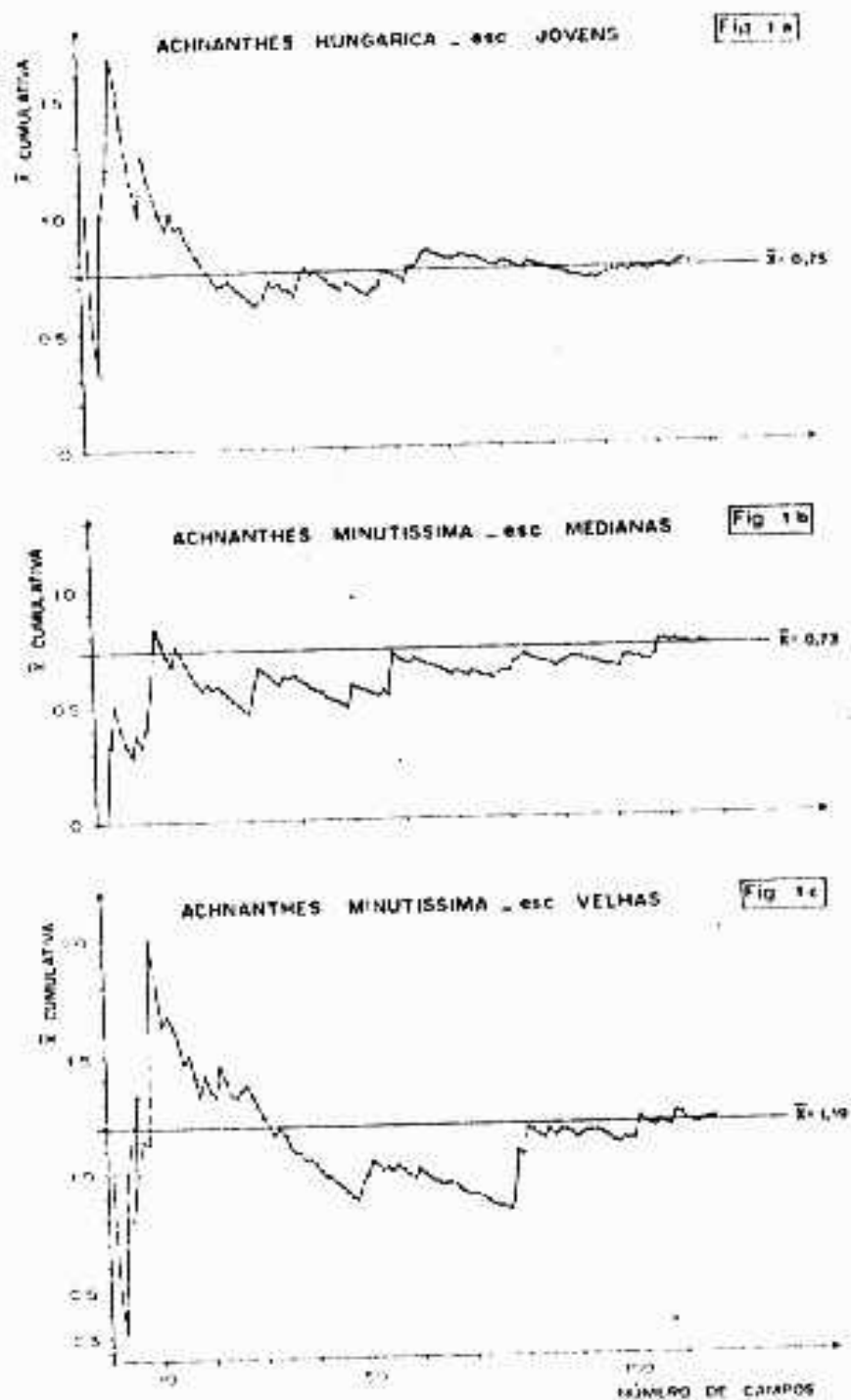


Figura 1 a-c - Média cumulativa da espécie dominante da comunidade de algas epifitas sobre escamas de *Riccioarpos natans*, Fig. 1a. escamas mais jovens; Fig. 1b. escamas medianas; Fig. 1c. escamas mais velhas (Scampo = 0,0085 mm²).

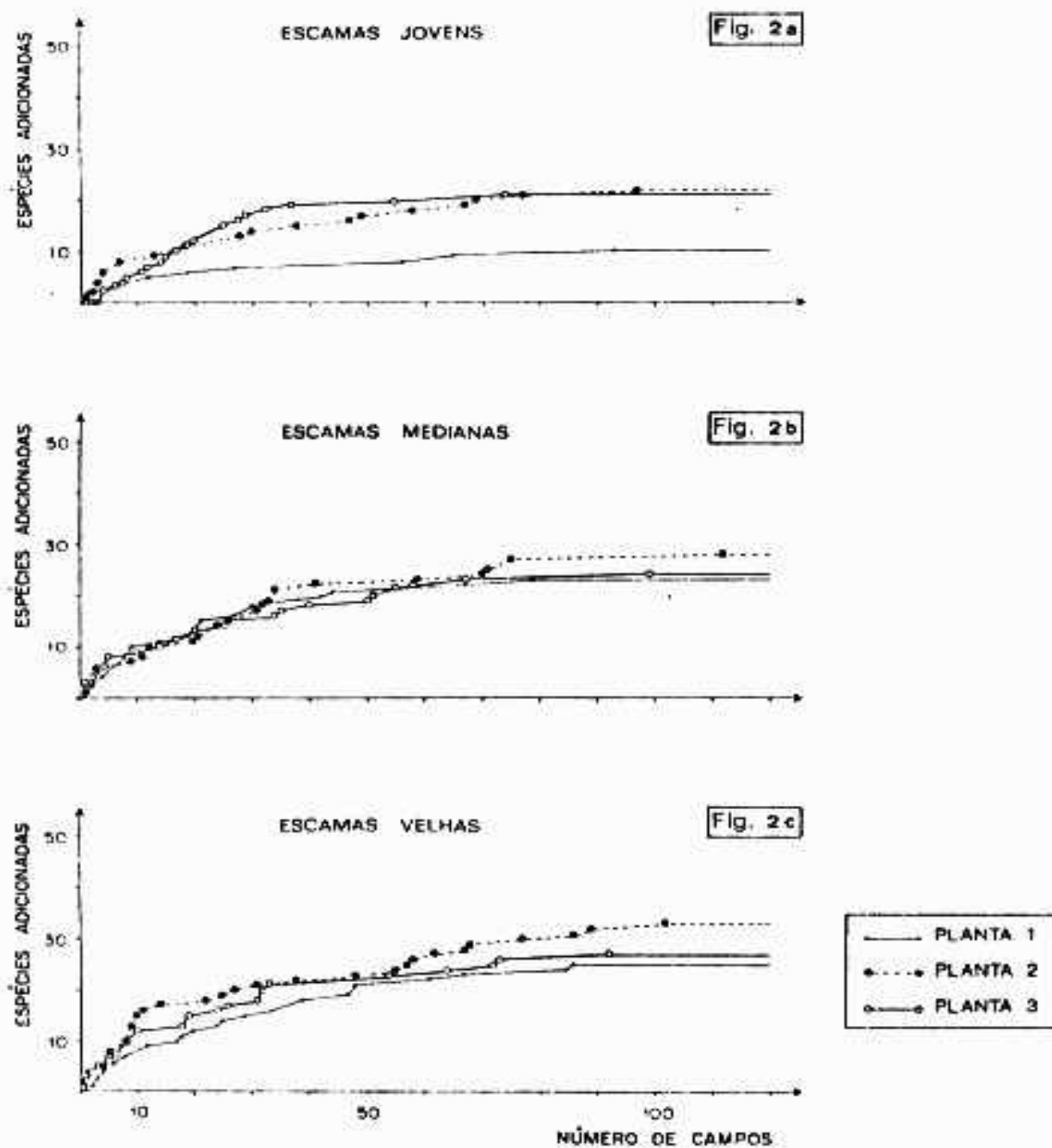


Figura 2 a-c - Número de espécies adicionadas de uma comunidade de algas epifitas em função da área amostrada das escamas de *Ricciocarpus natans*, Fig. 1a. escamas mais jovens; Fig. 1b. escamas medianas; Fig. 1c. escamas mais velhas (Scampo = 0,0085 mm²).

micrófita (GOUGH & WOELKERLING, 1976).

FIXAÇÃO DO MATERIAL

Atenção deve ser dada à preservação do material em função do método de contagem a ser utilizado.

O perifíton removido tem sido fixado com formalina a 3-4% ou com FAA para contagens em membrana-filtro ou câmara de Sedgwick-Rafter, ou com lugol acético, conforme método de Utermöhl. Para contagens "in situ", tem-se empregado mais freqüentemente formalina a 3-4%. Todavia, sempre que possível, é recomendável examinar amostra fresca para facilitar o reconhecimento de certas espécies durante a contagem. A comunidade mais firmemente aderida é composta por uma grande variedade de algas diminutas e frágeis, cujas características taxonômicas, em certos casos até mesmo a nível genérico, podem ser danificadas com o fixador.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como um método pode ser adequado em uma dada condição e insatisfatório em outras, e pela inexistência de metodologias unificadas, especial atenção deve ser dada às condições particulares de cada investigação. Apesar desta problemática, algumas sugestões gerais podem ser feitas para a quantificação de algas perifíticas, como segue: a) sempre que possível, analisar material vivo, principalmente os mais frágeis, e proceder à sua identificação previamente à enumeração da comunidade; b) estudos preliminares são necessários para a escolha do método de contagem e, quando preciso, da técnica de remoção; c) dar preferência aos métodos "in situ" sempre que as condições permitirem; d) estudos preliminares são também necessários na determinação

do número de réplicas e da área mínima a ser quantificada do substrato, ou do sedimento concentrado pelos métodos mencionados para o fitoplâncton; e) enumeração por campos aleatórios é recomendada; f) a quantificação em termos de indivíduos, área ou volume celular é função do propósito do trabalho; g) maior esforço deve ser despendido no sentido de expressar os dados quantitativos por unidade de área-padrão do substrato; e h) na utilização de substratos artificiais, estudos preliminares adicionais são necessários na escolha do tipo de substrato, número de réplicas, tempo de exposição, entre outros.

Finalmente, estudos estatísticos sobre a reprodutibilidade dos métodos quantitativos, bem como sobre a comparabilidade entre os mesmos são urgentes. Destes estudos depende uma futura uniformização das análises quantitativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOUDORESQUE, C.F. Méthodes d'étude qualitative et quantitative du benthos (en particulier du phytobenthos). Tethys, 3 (1): 79-104, 1971.
- BOWKER, D.W. & DENNY, P. The seasonal succession and distribution of epiphytic algae in the phyllosphere of *Lemna minor* L. Arch. Hydrobiol., 90(1): 39-55, 1980.
- _____. The spatial distribution of algae on shoots of emergent macrophytes in a Reedswamp in the littoral zone of lake Windermere. Nova Hedwigia, 37: 389-401, 1983.
- BOWKER, D.W.; TEUTEM, W.; FRY, J.C. A note on "stomaching" for the quantitative sampling of epiphyton. Freshwater Biol., 16: 123-25, 1986.
- BROWN, H.D. A comparison of the attached algal communities

- of a natural and an artificial substrate. J. Phycol.,
12: 301-06, 1976.
- BROWN, S.D. & AUSTIN, A.P. A method of collecting periphyton
in lentic habitats with procedures for subsequent sample
preparation and quantitative assessment. Int. Rev. Ges.
Hydrobiol., 56(4): 557-80, 1971.
- CARTER, C.C. A technique for direct microscopic observation
of periphyton assemblages on aquatic macrophytes. J.
Aquat. Pl. Mgmt., 20: 53-6, 1982.
- CATTANEO, A. The microdistribution of epiphytes on the
leaves of natural and artificial macrophytes. Br.
Phycol. J., 13(2): 183-88, 1978.
- _____. Periphyton in lakes of different trophy. Can.
J. Fish. Aquat. Sci., 44: 296-303, 1987.
- _____. The relative contribution of aquatic macrophytes
and their epiphytes to the production of macrophyte beds.
Limnol. Oceanogr., 25: 280-89, 1980.
- CATTANEO, A. & KALFF, J. Seasonal changes in the epiphyte
community of natural and artificial macrophytes in Lake
Memphremagog (Que. & VT.). Hydrobiologia, 60(2):
135-44, 1978.
- DELBECQUE, E.J.P. Periphyton on nymphaeids: an evaluation of
methods and separation techniques. Hydrobiologia, 124:
85-93, 1985.
- ELLIOT, J.M. Some methods for the statistical analysis of
samples of benthic invertebrates. 2. ed. London, The
Ferry House, 1977. 157 p.
- GODWARD, M.B. An investigation of the causal distribution

- of algal epiphytes. Beih. Bot. Zbl., 52(3): 506-39, 1934.
- GONS, H.J. Structural and functional characteristics of epiphyton and epipelon in relation to their distribution in Lake Vechten. Hydrobiologia, 95: 79-114, 1982.
- GOUGH, S.B. & WOELKERLING, W.J. On the removal and quantification of algal Aufwuchs from macrophyte hosts. Hydrobiologia, 48(3): 203-07, 1976.
- HICKMAN, M. & KLARER, D.M. Methods for measuring the primary productivity and standing crops of an epiphytic algal community attached to *Scirpus validus* Vahl. Int. Rev. Ges. Hydrobiol., 58: 893-901, 1973.
- HO, S.C. Structure, species diversity and primary production of epiphytic algal communities in the Schöhsee (Holstein). Germany, Universität Kiel, 1979. (Tese de Doutorado)
- JONES, J.C. A method for observation and enumeration of epilithic algae directly on the surface of stones. Oecologia, 16: 1-8, 1974.
- LUND, J.W.G.; KIPLING, C.; LE CREN, E.D. The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. Hydrobiologia, 11: 143-70, 1958.
- McNABB, C.D. Enumeration of freshwater phytoplankton concentrated on the membrane filter. Limnol. & Oceanogr., 5: 57-61, 1960.
- MOSS, B. The effects of fertilisation and fish on community structure and biomass of aquatic macrophytes and epiphytic algal populations: an ecosystem experiment. J. Ecol., 64(1): 313-42, 1976.

- ROBINSON, G.G.C. Methodology: the key to understanding periphyton. In: WETZEL, R.G., ed. Periphyton of freshwater ecosystems. The Hague, Dr. W. Junk, 1983. p. 245-51.
- SANDGREN, C.D. & ROBINSON, J.V. A stratified sampling approach to compensating for non-random sedimentation of phytoplankton cells in inverted microscope settling chambers. Br. Phycol. J., 19(1): 67-72, 1984.
- SLÁDECKOVÁ, A. Limnological investigations methods for the periphyton ("Aufwuchs") community. Bot. Rev., 28(2): 286-350, 1962.
- UEHLINGER, V. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. Archs. Sci., 17(2): 121-223, 1964.

ENDEREÇO DO AUTOR

BICUDO, D.C.
Instituto de Botânica
Seção de Ficologia
Caixa Postal 4005
01051 São Paulo - SP