

Acta Limnol. Brasil.	Vol. III	477-491	1990
----------------------	----------	---------	------

METODOLOGIA PARA O ESTUDO QUALITATIVO DAS ALGAS DO PERIFÍTON

BICUDO, C.E.M.*

RESUMO

O trabalho é uma síntese de vários dos métodos atualmente utilizados para o estudo qualitativo de algas do perifíton. Inclui métodos para coleta, fixação, preservação e estudo do material, sempre buscando selecionar os melhores e os mais exeqüíveis para a realidade brasileira e oferecendo os prós e os contras a utilização de cada um. Além disso, são comentadas certas dificuldades inerentes ao estudo taxonômico das algas do perifíton, tais como: a ausência de fases de reprodução, a quantidade insuficiente de organismos disponíveis para interpretação da variabilidade encontrada, a carência de estruturas vegetativas de valor diacrítico, etc. São Também considerados problemas referentes à carência de literatura e, principalmente, de chaves para identificação especificamente de algas perifíticas; e, finalmente, considerados os centros e seus respectivos especialistas em taxonomia de algas do perifíton hoje atuantes no Brasil.

* IBt - São Paulo, SP

**ABSTRACT - METHODOLOGIES FOR QUALITATIVE STUDY OF
PERIPHYTIC ALGAE**

This article presents a synthesis of various methods presently used for qualitative studies of periphytic algae. It includes methods for collection, fixation, preservation, and study of the algal material, always attempting to select the best and more according ones for the Brazilian present reality, and offering all arguments for and against utilization of each. Certain difficulties inherent in the taxonomic study of periphytic algae, such as the absence of reproductive stages, insufficient amounts of individual organisms available for interpretation of variability, lack of vegetative structures of diacritical value, etc are considered. Problems related to the paucity of literature, chiefly of identification keys specific for periphytic algae are also considered. Reference is made to centers in Brazil and their respective specialists presently active in the taxonomy of algal periphyton.

INTRODUÇÃO

A Limnologia existe, como campo científico distinto, há pouco menos de um século. O conhecimento, entretanto, da vida nas águas doces é muito mais remoto e data dos dias de Aristóteles, embora nesse período primevo, dada a enorme mistura de fatos e fantasias, seu conhecimento fosse de pouco valor científico.

A descoberta do plâncton dependeu, por sua vez, da invenção do microscópio. E a evolução de seu estudo, do progresso da tecnologia das lentes. Durante os já quase dois séculos de planctologia, muito se acumulou sobre sua sistemática, fisiologia e ecologia. Em contraposição, existe ainda atualmente uma enorme escassez de informações

sobre as algas presas ou frouxamente agregadas a substratos em regiões litorâneas de lagos ou em zonas rasas de rios. WETZEL (1975) afirmou que os táxons dessas algas, sésseis em sua maioria, já são bem conhecidos e o que falta ainda por obter são dados referentes à distribuição das espécies, à dinâmica sazonal das populações, à utilização de microhabitats, a respostas a condições físico-químicas do ambiente, etc.

Na verdade, bastante já se conhece sobre a sistemática do fitoplâncton, a ponto de várias flóruas terem sido publicadas para distintas partes do mundo, principalmente desde o início deste século. Enquanto isso, nenhuma de algas perifíticas com a abrangência das fitoplanctônicas foi jamais publicada. Não existe sequer uma sistemática de algas do perifíton, mas uma de algas de águas doces em geral, onde a dominância absoluta é de organismos do plâncton e onde os do perifíton aparecem, via de regra, citados por conta de sua ocorrência eventual em coletas de plâncton em locais ricos em vegetação aquática superior.

O mundo carece também, atualmente, de sistematas especialistas em algas do perifíton. Ao contrário do que afirmou WETZEL (1975), acho que muito pouco ainda foi feito sobre a composição florística do perifíton em todo o mundo. E o pouco que existe é devido ao labor dos fitoplanctólogos de conhecimento eclético e mente curiosa como, por exemplo, dos tcheco-eslovacos Pascher e Ettl, dos estado-unidenses Smith e Prescott, do francês Bourrelly, do belga Compère ou do argentino Tell, entre outros. Diante deste panorama, paradoxalmente, o próprio WETZEL (1975) afirmou que o conhecimento da taxonomia das espécies de organismos fixos é da maior importância e requer a atuação de taxonomistas adequadamente capacitados. Concordo, absolutamente, que este é o "cul de sac" momentâneo dos estudos sobre o perifíton. Em várias circunstâncias, vejo na comunidade dos perifitólogos tentar-se começar a construção da casa pelo

telhado!

Isto posto, a idéia seguinte é abordar certos aspectos que me foram especialmente encomendados, tais como: a coleta, a fixação, a preservação, a metodologia para os estudos taxonômicos, a bibliografia específica e o panorama nacional presente dos estudos taxonômicos sobre o perifíton. Neste afã, minha idéia não foi a de exaurir a metodologia que, incrivelmente, é muito vasta. O que busquei, foi selecionar alguns dos métodos, porém, preocupando-me com expor algo para os centros bem dotados e algo para os mais carentes financeiramente. Para os primeiros, recomendo até a última linha de equipamentos e para os segundos, especialmente, a força da imaginação e momentos de absoluta criatividade.

COLETA

A questão óbvia a responder, antes da escolha da metodologia para a coleta do material, é: qual o objetivo de nossa pesquisa?

Conforme SLÁDECKOVÁ (1962), a maioria dos trabalhos sobre perifíton refere-se somente ou predominantemente à análise qualitativa da comunidade, isto é, à sua taxonomia e divide-os em quatro grupos de acordo com a problemática em cada um. Assim, o primeiro grupo inclui os levantamentos propriamente ditos dos organismos perifíticos de uma determinada localidade. O segundo, aos estudos ecológicos. Este é, seguramente, o mais extenso dos quatro grupos em número de trabalhos publicados e nele o tratamento taxonômico é de profundidade variada, porém, usualmente levado apenas ao nível gênero ou mesmo família ou classe. Raramente, a espécie. Neste grupo, o maior detalhamento taxonômico é encontrado nos trabalhos de sucessão anual e de desenvolvimento de comunidades ao estágio clímax. O terceiro grupo engloba os trabalhos que

discutem o papel do perifíton na produtividade aquática e, principalmente, sua importância como fonte de alimento para peixes e outros animais aquáticos. E o quarto e último grupo inclui uma gama heterogênea de trabalhos, cujo elo comum é referir-se às relações da comunidade perifítica com os distintos problemas da hidrobiologia aplicada (poluição aquática, águas de abastecimento, "fouling" de fundos de embarcações e de construções submersas, torres de resfriamento, túneis de irrigação, entupimentos de redes de pesca, etc.). Nos trabalhos dos dois últimos grupos, o tratamento taxonômico é tão diversificado quanto nos do segundo.

Diante de uma tal riqueza de temas, é evidente a diversidade dos processos de coleta a adotar.

A primeira preocupação é decidir se a coleta deve atender a estudos qualitativos apenas e/ou também aos quantitativos.

SUBSTRATOS NATURAIS

No caso de ser uma coleta puramente qualitativa, processos como o arranque manual de plantas submersas ou de partes submersas de vegetação aquática superior, o aprisionamento de animais aquáticos ou a coleta de qualquer outro tipo de substrato, que possibilite a fixação definitiva ou mesmo temporária do perifíton, são satisfatórios. Tais substratos ou partes deles e outros podem ser raspados com uma espátula, escova ou mesmo lâmina de barbear, com a finalidade de isolar o perifíton. Outras vezes, a raspagem pode ser providenciada por meio de um pincel de pêlos de marta, por exemplo, que causam menor dano às estruturas dos organismos perifíticos utilizadas no processo identificatório. Porém, este processo dificilmente destaca as organelas de fixação dos perifitantes, principalmente aquelas muito intimamente aderidas ao

substrato. E tais estruturas podem ser importantes para o processo identificatório. Em qualquer circunstância, recomenda-se raspar áreas de tamanho suficientemente grande para incluir todos os tipos de formas de crescimento existentes.

De todos os processos mencionados, o melhor é levar para o laboratório os substratos inteiros, ou partes deles, para observação — sempre que possível — diretamente ao microscópio. É evidente que a observação direta vai depender do tipo e da espessura do substrato, o que será discutido posteriormente.

Há, inclusive, processos mais sofisticados para a coleta do perifíton e que fazem uso de dragas e de pequenos equipamentos raspadores. Ou, quando se pretende observar "in situ" o material, como por exemplo de um barco, pode-se utilizar de um periscópio ou até de equipamento de televisão.

SUBSTRATOS ARTIFICIAIS

Em determinadas circunstâncias, dado o tipo de trabalho a desenvolver — como os de colonização, sucessão sazonal, distribuição vertical, etc. — a utilização de substratos artificiais é recomendável. Qualquer tipo de substrato pode ser empregado: madeira, couro, vidro, metal, materiais plásticos, etc. A seleção do tipo está diretamente ligada à natureza da pesquisa que pretendemos realizar e à maior ou menor facilidade de visualização do material ao microscópio. Pensando-se mais neste último aspecto, são preferíveis — e amplamente utilizados — os substratos hialinos, do tipo vidro ou plástico, só porque permitem observação direta do material ao microscópio.

A utilização de substratos artificiais implica em sua fixação no ambiente, para que permita a instalação das algas. E aqui funcionou muito a imaginação do usuário,

tanto que já é verdadeiramente enorme a quantidade de pequenos aparelhos inventados. Destes, inclusive, muitos são apenas adaptações diferentes para atender ao mesmo fim. O que se aconselha é utilizar a imaginação de maneira infinita, limitada apenas pela matéria-prima disponível. É importante também considerar, que a escolha do tipo de substrato, se madeira, vidro, plástico ou o que seja, repito, vai depender muito do trabalho em mente.

FIXAÇÃO E PRESERVAÇÃO

O ideal é realizar o estudo do material vivo, condição esta que possibilita ao taxonomista a melhor visualização das características morfológicas dos espécimes e, conseqüentemente, sua melhor utilização no processo de identificação taxonômica. Mas, poucas vezes isto é possível. Questões principalmente de distância, de tempo e de menores facilidades para o trabalho de campo induzem à fixação e à preservação da amostra previamente ao seu estudo. Isto se faz pelo uso de soluções fixadoras e preservativas.

A solução fixadora ideal é aquela de fácil obtenção e que não altera as estruturas internas e externas das algas. Tal solução, obviamente, não existe. Dos fatos mais comuns resultantes de uma super-fixação constam, por exemplo, a contração do protoplasma na região mediana da célula e descoloração dos cloroplastídios. Em muitos casos, as alterações na localização, na forma e na coloração dos cloroplastídios normalmente acarretam prejuízo à identificação taxonômica do material. O que se busca, então, na prática, é uma solução que menos dano cause à aparência das algas e, principalmente, às suas estruturas utilizadas no processo de identificação taxonômica. Neste caso, é importante salientar que algumas são mais afetadas por certos compostos químicos que outras, particularmente

no que diz respeito à cor e à forma dos plastídios.

Existem inúmeras soluções fixadoras e preservativas disponíveis para o fitoplâncton e que podem ser utilizadas para o perifíton. De tantas, a de mais fácil preparação é a de formalina (= formol comercial ou formol a 40%). A literatura refere-se a uma solução aquosa a 4% de formalina, porém, nossa experiência demonstrou que a 2 ou 3% é muito mais eficaz na manutenção intacta das características diagnósticas dos organismos, principalmente de cloroplastídios e de flagelos. Bons resultados também são conseguidos ao usar a Solução de Transeau ou vulgarmente chamada de "6:3:1" e que é preparada da seguinte maneira:

6 partes de água
3 partes de álcool etílico 95°G.L.
1 parte de formalina (formol a 40%)

A fixação e preservação do material são feitas adicionando-se um volume da solução igual ao da própria amostra, isto é, na proporção de 1:1. A única desvantagem do uso desta solução é a quantidade dela que se utiliza a cada vez, muito maior do que a de formalina a 3%, por exemplo. Além do custo envolvido, é impraticável levar Solução de Transeau ao campo quando a excursão é de maior duração ou quando o número esperado de amostras a coletar é elevado.

Outro bom fixador e preservativo é a chamada solução de F.A.A., a qual é preparada da seguinte maneira:

Formalina.....	65 ml
Álcool etílico 95°G.L. a 50%.....	1000 ml
Ácido acético glacial.....	30 ml

O ácido propiônico garante melhor fixação do que o acético e, por isso, certos autores substituem o último por

igual volume do primeiro no F.A.A., transformando-o em F.A.P.

Existem muitos outros fixadores e preservativos citados na literatura universal sobre microtécnica como, por exemplo, a mistura de Keefe, o líquido de Bauin, o líquido de Allen B-15, o líquido de Navashin, etc. Qualquer compêndio sobre microtécnica vegetal, como o de JOHANSEN (1940), por exemplo, contém as formulações e as condições para uso de qualquer uma dessas soluções.

É igualmente muito importante lembrar, que cada solução tem prós e contras sua utilização. Há, inclusive, as que são específicas para determinados grupos taxonômicos de algas ou tipo de algas. De tal forma, que o emprego desta ou daquela solução dependerá inteiramente das disponibilidades orçamentárias do laboratório e das condições de coleta do material.

Finalmente, o material perifítico pode ser estocado ou após a raspagem, exatamente da mesma maneira que o fitoplâncton ou, de preferência, sobre seu próprio substrato (caso de epífitas, epizoárias, epilíticas, etc.) ou com o substrato ao qual se achava frouxamente agregado ou aderido (metafíton).

ESTUDO DO MATERIAL

Não existe uma metodologia assentada para se realizar ao microscópio o estudo de material perifítico. Relega-se muito atualmente ao bom senso.

Dominam hoje os autores que preferem trabalhar com o material destacado de seus substratos e montado, como o fitoplâncton, em água ou no próprio fixador, entre lâmina e lamínula. Tal processo, entretanto, freqüentemente impede a visualização das estruturas de fixação dos materiais e fragmenta os talos crostosos dificultando, em consequência, sua interpretação taxonômica. Em certos casos, de algas

muito intimamente aderidas ao substrato, o processo pode até não destacá-las. De qualquer forma, o exame qualitativo pode, por conseguinte, não ser fiel tanto pelo não-encontro de certas algas no destacado, quanto pela impossibilidade de identificação de vários organismos devido à ausência ou à deficiência de estruturas que são diagnósticas para sua taxonomia.

O recomendado para a análise qualitativa do perifíton é trabalhar com o material vivo e "in situ", isto é, ainda sobre seus respectivos substratos. Neste caso, a idéia é colocar fragmentos do substrato diretamente ao microscópio, entre lâmina e lamínula, para observação imediata. Então, o problema vai ser a espessura do substrato e, conseqüentemente, sua maior ou menor transparência ao microscópio. As escamas submersas da briófita flutuante *Ricciocarpos natans* podem ser destacadas inteiras e colocadas direto entre lâmina e lamínula para seu exame taxonômico, pois possuem apenas uma camada de células de espessura e quase não têm pigmentação. Folhas de *Mayacca* ou *Anacharis* também se prestam à observação direta ao microscópio, embora a pigmentação perturbe um pouco a visualização dos epífitos. Entretanto, pode-se retirar a maior parte da pigmentação das folhas ao colocá-las, destacadas, numa Placa-de-Petri contendo água e diretamente expostas ao sol por 12 a 15 dias antes da observação ao microscópio. Outras estruturas que se pode observar com sucesso diretamente ao microscópio, são as folhas submersas e modificadas em pêlos de *Salvinia*, uma pteridófita aquática também flutuante. Tais pêlos são unisseriados e apigmentados, o que permite fácil visualização do perifíton fixo. As filosferas das Lemnaceae também permitem observação relativamente fácil do material perifítico, porém, não antes de serem clarificadas de sua pigmentação da mesma forma que se propôs para as folhas de *Mayacca* ou *Anacharis*.

Os pecíolos ou o limbo das folhas de *Nymphaea*, as

bainhas das folhas de Cyperaceae, os caules de Pontederiaceae, por exemplo, também permitem exame direto ao microscópio se destacarmos pedaços bem delgados de suas epidermes com o auxílio de bisturi, escalpelo ou lâmina de barbear. Nestas circunstâncias, o importante é cortar secções o mais delgadas possível, para permitir seu atravessamento pela luz do microscópio.

Quando for desejado ou permitido apenas o uso de material fixado e preservado, o procedimento para seu exame ao microscópio é idêntico; porém, quando for preciso a clarificação do substrato, esta é conseguida deixando-se porções do mesmo expostas diretamente à luz por 12 a 15 dias ou até à sua completa translucência. Em seguida, deve-se colocá-las em solução a 98% de glicerina, o que conferirá aspecto quase que totalmente hialino aos pedaços de substrato.

No caso de material perifítico crescendo sobre substratos artificiais suficientemente transparentes, como é o caso de vidro ou lâmina de acetato, por exemplo, pode-se conseguir seu exame direto ao microscópio limpando-se uma das faces do mesmo, ao acaso, e olhando-se-o coberto por lamínula grande.

BIBLIOGRAFIA TAXONÔMICA

Examinando o material perifítico ao microscópio, feitos os esquemas demonstrando, o melhor possível, suas características morfológicas de interesse para a identificação taxonômica e anotadas suas diversas medidas e alguma observação de cunho químico ou de ilustração impossível, está-se em condição de tentar "batisá-lo". Aqui começa outro problema: a carência de literatura especializada e de chaves de identificação.

Já o disse antes — e repito! — praticamente não existem hoje referências florísticas específicas para o

material de algas perifíticas. As referências existem, mas encontram-se dispersas nas flóruas de fitoplâncton, como as coordenadas no passado por Huber-Pestalozzi (ainda inacabada), Pascher (em fase de substituição pela de Ettl, Gerloff, Heyning e Mollenhauer), Rabenhorst e algumas outras. A maioria dos volumes em cada uma dessas floras contém chaves para identificação dos táxons relacionados. Entretanto, de 90 a 95% dos táxons nessas floras é de algas planctônicas e as espécies com representantes no perifiton - via de regra poucas - aparecem mais graças à curiosidade do autor do que por obra da real complementação da obra.

Outra fonte de referências taxonômicas sobre algas perifíticas são os trabalhos florísticos específicos. Porém, o montante destes trabalhos é hoje ainda muito pequeno e usualmente destituído de chaves para identificação dos materiais relacionados. A grande maioria dos trabalhos florísticos sobre algas perifíticas refere-se a diatomáceas e sua utilização na indicação de condições físico-químicas da água. Sobre determinados grupos de algas como, por exemplo, as Oedogoniophyceae, as Chaetophorales, as Cladophorales, que são exclusivamente de representantes bentônicos, existem excelentes trabalhos florísticos, tais como os de: Hirn, Tiffany, Van den Hoek, Printz, Mrozýnska-Webb, Nurul Islam, etc. Para os demais grupos, entretanto, existe apenas um ou outro trabalho publicado, porém, sempre sobre algum ambiente geográfico restrito e pequena abrangência taxonômica. Floras gerais, taxonomicamente abrangentes, inexistem mesmo para ambientes geograficamente restritos.

No processo de identificação propriamente dito, surge primeiro o problema do microscópio, que deve possuir um bom - para não dizer excelente - conjunto de lentes oculares e objetivas, principalmente objetiva de imersão em óleo. Deve também contar com um sistema de contraste-de-fase e ocular de medição além, é lógico, de câmara-clara. Em seguida, os problemas são as fases jovens

do desenvolvimento de várias algas, que são extremamente comuns neste grupo de organismos. Tais estádios jovens não permitem identificação e, o que é pior, podem levar a identificações errôneas. No caso de *Characium* e *Characiopsis*, por exemplo, há necessidade absoluta de análise populacional, graças ao extenso polimorfismo comum nas espécies de ambos esses gêneros, tanto depois de atingida sua maturidade mas, principalmente, durante seu desenvolvimento ontogenético. Outro fato que pode acarretar erro no processo de inventário florístico de algas do perifíton é o método selecionado para a coleta do material, mormente quando este foi por raspagem do substrato. Os erros vão por conta ora dos organismos que não se deixaram arrancar, ora dos que foram arrancados apenas parcialmente e justo as estruturas diagnósticas não despregaram com os organismos, ora dos que foram apanhados momentaneamente estéreis e a forma de reprodução - especialmente da sexuada - é indispensável para o processo identificatório, ora dos que foram coletados apenas em seus estádios juvenis e, nesta fase, não são identificáveis, ora dos que foram colhidos apenas em momentos de imaturidade reprodutiva, etc.

Por fim, constitui-se num problema sério a falta de tradição de pesquisa científica na maioria dos centros brasileiros, o que implica na constituição de bibliotecas em sua maioria pobres e, o que é muito pior, cada dia mais desatualizadas por conta do momento financeiro que vivemos.

O MOMENTO DO BRASIL

A situação presente no Brasil mostra apenas um especialista em taxonomia de algas perifíticas em geral, a Dra Denise de Campos Bicudo, do Instituto de Botânica de São Paulo. Além dela, a mestranda Lívia Fernanda Agujaro, do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de

Biologia Vegetal - da UNESP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", "campus" de Rio Claro, no interior do Estado de São Paulo, também possui capacitação suficiente para desenvolver taxonomia de algas perifíticas de modo geral. Inclusive, seu trabalho de dissertação está em fase final de redação e abrange tal aspecto com bastante profundidade. Há três outras pessoas que trabalham no país também com organismos do perifíton algáceo e que são: (1) o Dr. Orlando Necchi Júnior, da UNESP, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", "campus" de São José do Rio Preto, também no interior do Estado de São Paulo e que trabalha com Rhodophyceae de águas continentais, um grupo quase que exclusivamente bentônico; (2) a Profª Izabel Cristina Alves Dias, ligada ao Museu Nacional do Rio de Janeiro e que trabalha com as algas verdes filamentosas - Oedogoniophyceae e Chlorophyceae - que são todas ou quase todas formas bentônicas; e (3) a Profª Thelma Lúcia Veiga Ludwig, ligada à Universidade Federal do Paraná, cuja dissertação de mestrado referiu-se a diatomáceas (Bacillariophyceae) do perifíton. De nosso conhecimento, são apenas essas as pessoas atualmente com capacitação para identificar material de algas perifíticas a nível específico e até taxonomicamente mais íntimo em todo o país. É claro que vários outros, especialistas em formas planctônicas, podem perfeitamente atender à demanda da identificação qualitativa do perifíton. De qualquer forma, quando digo capacitação não quero referir-me apenas ao "know how" especializado necessário, mas também à infra-estrutura bibliográfica, aos fichários específicos, às metodologias adequadas, etc.

Em vista disso, a primeira recomendação que posso fazer é de que mais especialistas sejam preparados e espalhados pelos centros atuantes no país. Tal capacitação pode ser providenciada através de cursos específicos, condensados e de curta duração; e de estágios. O primeiro processo - o curso - atende simultaneamente a uma clientela

maior e destinar-se-ia a fornecer a metodologia especializada e a base taxonômica indispensável. Os estágios visariam mais à resolução de problemas específicos de taxonomia mais avançada ou ao aprendizado de "know how" mais específico.

A segunda recomendação - dependente diretamente da primeira - segue no sentido da identificação taxonômica do material algáceo do perifíton não ficar a nível apenas de gênero ou, pior ainda, de família ou classe. Trabalhos de variação sazonal da estrutura da comunidade não têm o mínimo sentido se não forem identificadas as espécies. Tampouco, os trabalhos de colonização, de indicação biológica ou de distribuição vertical, entre outros. Na ausência de sistemata ou da colaboração de um, é preferível expressar a porção algácea do perifíton em termos de biomassa, quando tal expressão for aceitável.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York, McGraw-Hill Book, 1940. 523 p.
- SLÁDECKOVÁ, A. Limnological investigation methods for the periphyton ("Aufwuchs") community. Bot. Rev., 28: 286-350, 1962.
- WETZEL, R.G. Limnology. Philadelphia, W.B. Saunders, 1975. 743 p.

ENDEREÇO DO AUTOR

BICUDO, C.E.M.
Instituto de Botânica
Secção de Ficologia
Caixa Postal 4005
01051 São Paulo - SP