

XXIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS

MONITORAMENTO EM ALTA FREQUÊNCIA DA DENSIDADE DO FITOPLÂNCTON ATRAVÉS DE MÉTODO DE FLUXO CONTÍNUO (*FLOWCAM*)

Isadora Menegon¹*; Juliana Bohnenberger¹; David da Motta Marques¹; Itzayana Gonzalez Ávila¹;
Cayo Lopes Bezerra Chalegres¹ & C. Ruberto Fragozo Jr²

RESUMO – Uma técnica recente, que está sendo empregada no monitoramento da densidade algácea, é a quantificação através de equipamento de fluxo contínuo, denominado *FlowCAM*, que determina instantaneamente o número, tamanho e forma das partículas microscópicas orgânicas de uma amostra de água. Neste trabalho, foi desenvolvido uma rotina para quantificação rápida da espécie de cianobactéria teste *Planktolyngbya contorta*, através do *FlowCAM*. Foram utilizadas amostras mensais de água superficial na zona pelágica da lagoa Mangueira (RS), no ano de 2013 que foram fixadas com solução aquosa de formalina a 3-5%. As amostras foram quantificadas pelo método padrão utilizando microscopia e também pelo *FlowCAM* no qual foram desenvolvidos filtros específicos para essa metodologia. Para testar diferenças significativas entre os métodos tradicional e *FlowCAM* foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney, e para diferenças entre os métodos e os meses amostrados foi utilizado o teste estatístico multivariado MANOVA. Os resultados mostraram diferenças significativas entre os métodos tradicional e *FlowCAM* ($P = 0,002$) e entre o *FlowCAM* e os meses amostrados ($P = 0,01$). Até o momento, o método de microscopia padrão, ainda, demonstrou maior eficiência que o *FlowCAM* em relação à determinação da densidade total da cianobactéria *Planktolyngbya contorta* na lagoa estudada.

ABSTRACT– A recent technique that is being employed in the monitoring of algal density is quantification using flow-through equipment, called *FlowCAM*, which instantly determines the number, size, and shape of organic microscopic particles in a sample of water. In this work, a routine was developed for the rapid quantification of cyanobacteria test *Planktolyngbya contorta* through *FlowCAM*. Monthly samples of superficial water were used in the pelagic zone of the Mangueira lagoon (RS), in the year 2013, which were fixed with 3-5% aqueous solution of formalin. Samples were quantified by the standard method using microscopy and also by *FlowCAM* in which specific filters were developed for this methodology. The Mann-Whitney statistical test was used to test significant differences between the traditional methods and *FlowCAM*, and the MANOVA multivariate statistical test was used for differences between the methods and the months sampled. The results showed significant differences between the traditional methods and *FlowCAM* ($P = 0,002$) and between *FlowCAM* and the sampled months ($P = 0,01$). To date, the standard microscopy method has been shown to be more efficient than *FlowCAM* in determining the total density of the cyanobacteria *Planktolyngbya contorta* in the studied lagoon.

Palavras-Chave – *FlowCAM*, fitoplâncton, monitoramento.

¹1) Instituto de Pesquisas Hidráulicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (isamenegon@hotmail.com, bonhju@yahoo.com.br, dmm@iph.ufrgs.br, i.goavil@gmail.com, cayolopesbc@gmail.com).

2) Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Brasil (carlosruberto@gmail.com).

*Autor Correspondente.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as espécies do fitoplâncton existe o grupo das cianobactérias que possuem estruturas especializadas que podem explicar seu sucesso em responder rapidamente às mudanças físicas, químicas e biológicas nos ambientes aquáticos, tornando-se, assim, na maioria das vezes, dominantes na comunidade fitoplanctônica e, portanto, são consideradas bioindicadoras de mudanças dentro do ambiente [Wojciechowski *et al.* (2017); Bohnenberger *et al.* (2018)]. Além disso, possuem potencial desenvolvimento de florações e produção de cianotoxinas, que podem causar desequilíbrio ao ecossistema aquático. Assim sendo, nota-se a necessidade do monitoramento dessa comunidade.

Para a obtenção de dados relacionados ao fitoplâncton são utilizadas técnicas microscópicas que demandam estudos altamente especializados, elevado tempo para especialização dos profissionais, pois estes necessitam ter conhecimento e domínio das diversas taxonomias do fitoplâncton [Bergkemper *et al.* (2018)]. Diante disso, surge a necessidade de técnicas rápidas, eficientes e universais para a obtenção de dados do fitoplâncton.

Em busca de estratégias de monitoramento mais eficiente, alguns trabalhos foram realizados utilizando o *FlowCAM* [Álvares *et al.* (2014); Wang *et al.* (2015); Feng *et al.* 2019]. Esse é um método totalmente automático que exibiu uma excelente precisão, de reprodutibilidade e eficiência na determinação da densidade celular e distribuição de tamanho da alga *Microcystis* sp. [Wang *et al.* (2015); Feng *et al.* (2019)]. O protocolo desenvolvido por Wang *et al.* (2015) foi aplicado com sucesso em amostras de campo do Lago Caohai (China) e mostrou-se preciso no monitoramento da dinâmica populacional e o tamanho das colônias de *Microcystis* sp. Além desse estudo, o trabalho realizado por Álvares *et al.* (2014) também mostrou essa precisão quando comparou uma técnica automatizada, baseada no *FlowCAM*, para analisar estimativas de abundância, espectros de tamanho, biomassa e diversidade taxonômica, em amostras fitoplanctônicas de um programa de monitoramento mensal no mar Cantábrico. Foram observadas diferenças mínimas em comparação com as estimativas microscópicas tradicionais. No entanto, foi percebido que os efeitos de conservação das amostras e imprecisões na classificação automática são as principais causas de discrepâncias na determinação da estrutura de tamanho entre as duas abordagens. Todavia, os resultados encontrados por Álvares *et al.* (2014) sugerem que as variações naturais nos atributos da comunidade explorada são de maior magnitude do que o erro introduzido pelos métodos e que o método totalmente automático é adequado para explorar estas variações.

O uso de equipamentos com tecnologia capaz de determinar instantaneamente o fitoplâncton de uma amostra de água nos permite acelerar essas respostas, otimizando o trabalho a ser desenvolvido. No entanto, ainda é preciso comparar os resultados encontrados com a metodologia tradicionalmente usada e ver se os resultados obtidos são realmente confiáveis, e se corroboram com resultados encontrados em outros trabalhos, como os mencionados acima, onde a utilização do *FlowCAM* mostraram diferenças mínimas em comparação com as estimativas microscópicas tradicionais.

2. OBJETIVO

Este trabalho buscou desenvolver uma rotina para quantificação rápida da espécie teste de cianobactéria *Planktolyngbya contorta*, através do *FlowCAM*, comparando essa quantificação com a do método de microscopia padrão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDO

A Lagoa Mangueira (Figura 1) está localizada no Sul do Rio Grande do Sul, compreendendo trechos dos Municípios de Santa Vitória do Palmar e do Rio Grande entre as latitudes 32°20'S e 33°00' S, e pela Lagoa Mirim e o Oceano Atlântico sul (52°20'W e 52°45'W), está próximo ao Arroio Chuí, na fronteira com o Uruguai. O clima da região, segundo o Sistema de Köppen-Geiger, é do tipo Cfa, apresentando precipitação distribuída em todos os meses ao longo do ano [Stape *et al.* (2013)] e seu estado trófico varia de oligotrófico a mesotrófico [Fragoso *et al.* (2011); Crossetti *et al.* (2013)]. As temperaturas dos meses mais quentes são em média superiores a 22°C, enquanto que as dos meses mais frios variam entre 18 e -3°C [Ferreira *et al.* (2005)]. Esta região apresenta precipitação anual de 1.300 mm e sofre forte ação dos ventos, a direção predominante é a de origem Nordeste [Gazulha *et al.* (2004)]. A Lagoa Mangueira é uma grande lagoa costeira rasa cobrindo uma área total de 820 km², e com 90 km de extensão e de 3 a 10 km de largura, com profundidade média 2,6 m e máxima de 6,0 m.

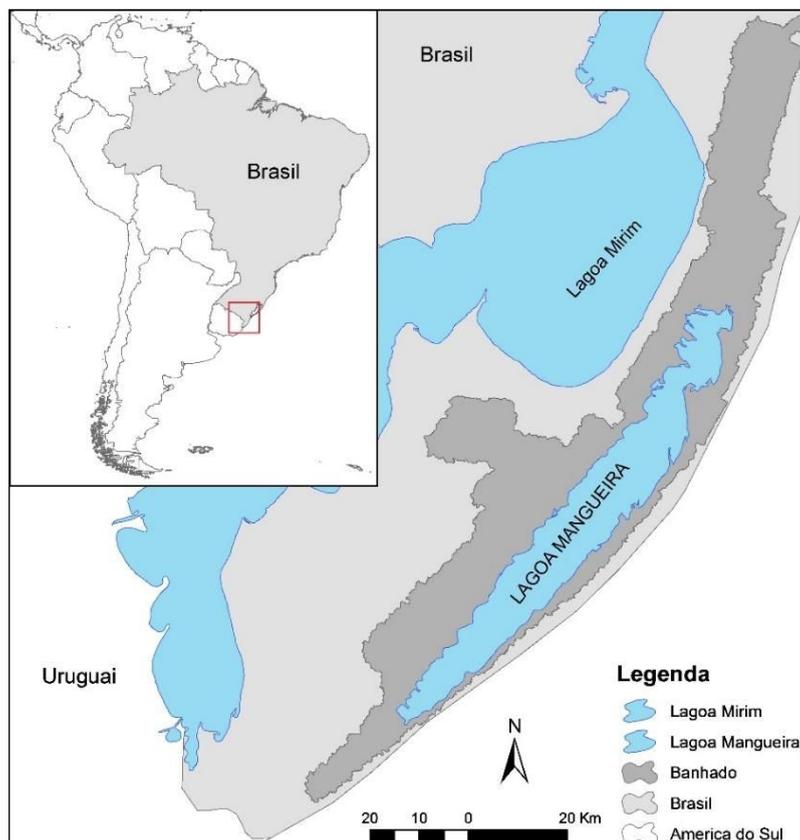


Figura 1 - Sistema Hidrológico do Taim.

AMOSTRAGEM

As amostras de água superficial foram coletadas mensalmente em 2013 na zona pelágica da Lagoa Mangureira - RS, sendo fixadas imediatamente com solução aquosa de formalina a 3-5% e estocadas em câmara fria ao abrigo da luz.

QUANTIFICAÇÃO POR MICROSCOPIA

Para a realização da quantificação da densidade da *Planktolyngbya contorta*, foram colocados 2 ml de cada amostra em câmaras de sedimentação, com tempo de sedimentação de 2 horas, sendo a contagem realizada com auxílio de microscópio invertido (Olympus Optical; IX70-S8F2). A metodologia tradicional de microscopia seguiu o Método de Utermöhl (1958) e tempo de sedimentação de Lund (1958).

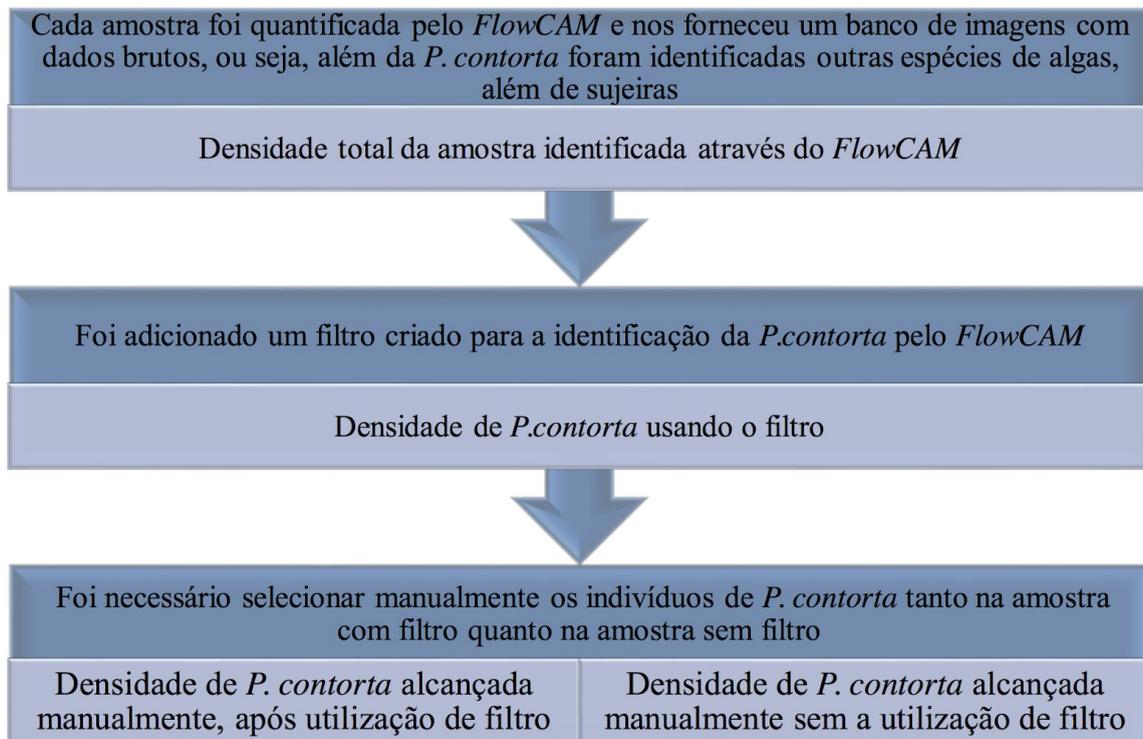
QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO POR *FLOWCAM*

A metodologia de fluxo contínuo utilizou o equipamento *FlowCAM* (Fluid Imaging Technologies, Inc; versão portátil) no qual combina múltiplas tecnologias tais como a citometria de fluxo, microscopia e detecção de fluorescência. Essa técnica utiliza o laser do equipamento para detectar a fluorescência e a dispersão da luz das partículas que passam pela célula de fluxo. Ao ser

detectada a fluorescência e a dispersão da luz, o câmera captura as partículas identificadas. Posteriormente, esse grupo de imagens capturadas é disponibilizado pela interface do equipamento e pode começar o processo de tratamento dos filtros. Nas amostras analisadas, foi utilizado células de fluxo de 50µm e aumento de 20X. A densidade total das algas (indivíduos por mililitros – ind./ml) foi quantificada em um volume amostral de 2 ml.

Para a identificação da *Planktolyngbya contorta*, utilizando o *FlowCAM*, foi criada uma biblioteca digital da cianobactéria da Lagoa Mangueira. A biblioteca consiste em um banco de critérios pré disponibilizados pelo software do equipamento e nele contém medidas básicas (comprimento, largura, área, volume alongado, entre outras), medidas morfológicas (circularidade, alongamento, perímetro, gradiente de borda, entre outras) e medidas de escala de cor (intensidade média, transparência, intensidade sigma, entre outras). Ao fornecer esses critérios de medidas, o *FlowCAM* classificou e filtrou automaticamente os indivíduos pertencentes a essa biblioteca.

Além disso, para análise dos resultados encontrados através do *FlowCAM* foi realizado o seguinte roteiro demonstrado no fluxograma a baixo:



ANÁLISE DOS DADOS

Para testar diferenças significativas entre os métodos tradicional e o *FlowCAM* foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney e para testar as diferenças entre os métodos e os meses amostrados foi utilizado o teste estatístico multivariado MANOVA.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças significativas entre os métodos tradicional e *FlowCAM* ($P = 0,002$). Foram observadas, também, diferenças significativas entre o *FlowCAM* e os meses amostrados ($P = 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre os meses e os demais métodos ($P > 0,05$) (Tradicional, *FlowCAM* manual com filtro e *FlowCAM* manual sem filtro). Nos meses de maio e novembro não foram encontrados indivíduos pertencente a espécie estudada pelo *FlowCAM*. Foi necessário criar um filtro específico para cada mês, conforme observado na tabela 1. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se os filtros diâmetro e simetria.

Tabela 1: Filtros utilizados na identificação da *P. contorta* pelo *FlowCAM* para cada um dos meses amostrados ao longo do ano de 2013 na Lagoa Mangueira, RS.

Janeiro	Fevereiro	Março	Abril	Junho	Setembro	Outubro
Circularidade	Diâmetro	Diâmetro	Diâmetro	Diâmetro	Diâmetro	Diâmetro
Compacidade	Perímetro	Simetria	Simetria	Simetria	Simetria	Simetria
Convexidade	Largura	Ch2/Ch1				Área
Gradiente de borda						
Espessos geodésicos						
Comprimento						

Legenda: Ch2/Ch1: divisão entre o valor máximo de fluorescência de duas medições.

Como se pode observar, é necessário otimizar o filtro padrão para identificação da *P. contorta* pelo *FlowCAM* e, com isso, permitir a identificação rápida, confiável e eficiente dessa espécie para a Lagoa Mangueira. Diferente do resultado encontrado neste estudo, o *FlowCAM* já mostrou excelente precisão em estimativas de abundância, espectros de tamanho e densidade da comunidade fitoplancônica quando comparados com os resultados obtidos por análise microscópica tradicional das mesmas amostras [Álvares *et al.* (2014); Wang *et al.* (2015)].

No entanto, na maioria dos estudos realizados foram utilizadas amostras vivas e retiradas de cultivos unialgais o que demonstra que estas amostras podem ter resultados mais satisfatórios devido o *FlowCAM* dispor de detecção por fluorescência [Dashkova *et al.* (2016)]. O uso de corantes, como vermelho neutro, azul de Evans, azul de tripan e SYTOX Green já foram utilizados para uma melhor identificação dos indivíduos [Matiello (2014)]. Além disso, a utilização do *FlowCAM* para a identificação em nível de grupo pode se enquadrar melhor do que em relação a nível de espécie.

5. CONCLUSÃO

O método de microscopia tradicional demonstrou maior eficiência que o *FlowCAM* em relação à determinação da densidade total da cianobactéria *Planktolyngbya contorta* na Lagoa Mangueira, RS.

Os resultados obtidos até o momento representam importantes conhecimentos sobre a metodologia *FlowCAM* em comparação com a metodologia padrão. São necessários ajustes adicionais dos critérios para a identificação das espécies de fitoplâncton da Lagoa Mangueira, não somente a quantificação dos indivíduos, com a formatação de uma biblioteca digital dessas espécies. Após o término dessa biblioteca, será possível quantificar a densidade e a biomassa de cada espécie. Espera-se com o desenvolvimento do *FlowCAM* a determinação expedita da composição e densidade de fitoplânctônica em amostras de água (naturais ou fixadas), demonstrando qualidade, eficiência e confiabilidade nos resultados obtidos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, E.; MOYANO, M.; LOPEZ-URRUTIA, A.; NOGUEIRA, E.; SCHAREK, R. (2014). “*Routine determination of plankton community composition and size structure: a comparison between FlowCAM and light microscopy*”. *Journal of Plankton Research* 36, pp. 170 – 184.
- BERGKEMPER, V.; WEISSE, T. (2018). “*Do current European lake monitoring programmes reliably estimate phytoplankton community changes?*”. *Journal Hydrobiologia* 824, pp. 143 – 162.
- BOHNENBERGER, J. E., SCHNECK, F., CROSSETTI, L. O., LIMA, M. S., & MOTTA-MARQUES, D. D. (2018). “*Taxonomic and functional nestedness patterns of phytoplankton communities among coastal shallow lakes in southern Brazil*”. *Journal of Plankton Research* 40(5), pp. 555 – 567.
- CROSSETTI, L.O.; BECKER, V.; de SOUZA CARDOSO, L.; RODRIGUES, L.R.; da COSTA, L.S.; MOTTA-MARQUES, D. (2013). “*Is phytoplankton functional classification a suitable tool to investigate spatial heterogeneity in a subtropical shallow lake?*” *Limnol. Ecol. Manag. Inland Waters* 43, pp. 157 – 163.
- DASHKOVA, V.; SEGE, E.; MALASHENKOV, D.; KOLTER, R.; VOROBYEV, I.; BARTENEVA, N. S. (2016). “*Microalgal cytometric analysis in the presence of endogenous autofluorescent pigments*”. *Algal Research* 19, pp. 370 – 380.

FRAGOSO, C.R., JR.; MARQUES, D.M.M.; FERREIRA, T.F.; JANSE, J.H.; van NES, E.H. (2011). “*Potential effects of climate change and eutrophication on a large subtropical shallow lake*”. *Environmental Modelling & Software* 26(11), pp. 1337 – 1348.

FENG, B., WANG, C., WU, X., TIAN, C., TIAN, Y., & XIAO, B. (2019). “*Involvement of microcystins, colony size and photosynthetic activity in the benthic recruitment of Microcystis*”. *Journal of Applied Phycology* 31(1), pp. 223 - 233.

GAZULHA, V. (2004). “*Comunidade zooplancônica associada a banhado e lagoa interna no Sistema Hidrológico do Taim, litoral sul do Rio Grande do Sul, Brasil*”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 116p.

LUND, J. W. G.; KIPLING, C.; LE CREN, E. D. (1958). “*The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting*”. *Hydrobiologia* 11, pp. 143 – 170.

MATTIELLO I. D. L. V. (2014). “*Avaliação de corantes para a detecção da viabilidade do fitoplâncton marinho*”. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

STAPE, J. L., ALVARES, C., SENTELHAS, P. C., DE MORAES GONCALVES, J., & SPAROVEK, G. (2013). “*Köppen’s climate classification map for Brazil*”. *Meteorologische Zeitschrift* 22, pp. 711 – 728.

UTERMÖHL, H. (1958). “*Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel*”. *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Mitteilungen* 9, pp. 1 – 38.

WANG, C. B.; WU, X.Q.; TIAN, C.C.; LI, Q.; TIAN, Y.Y.; FENG, B.; XIAO, B.D. (2015). “*A quantitative protocol for rapid analysis of cell density and size distribution of pelagic and benthic Microcystis colonies by FlowCAM*”. *J Appl Phycol* 27, pp. 711 – 720.

WOJCIECHOWSKI, J., HEINO, J., BINI, L. M., & PADIAL, A. A. (2017). “*Temporal variation in phytoplankton beta diversity patterns and metacommunity structures across subtropical reservoirs*”. *Freshwater biology* 62, pp. 751 – 766.

FERREIRA, T. F. (2005). “*Ecologia e aplicabilidade de métodos para avaliação da produção primária de Zizaniopsis bonariensis: uma macrófita aquática emergente, no Sistema Hidrológico*

do Taim, RS”. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 141p.

AGRADECIMENTOS –Os autores agradecem as bolsas de pesquisa CNPq e a CAPES utilizada pelos envolvidos.