

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL**

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

PEDRO BESCHOREN DA COSTA

**Determinação da densidade celular da cianobactéria
Microcystis aeruginosa por espectrofotometria:
validação de um método para uso em pesquisa**

Porto Alegre – RS

2009

Pedro Beschoren da Costa

**Determinação da densidade celular da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*
por espectrofotometria: validação de um método para uso em pesquisa**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Profa. Dra. Maria Teresa Raya-Rodriguez

Porto Alegre – RS

2009

Pedro Beschoren da costa

Determinação da densidade celular da cianobactéria *Microcystis aeruginosa* por espectrofotometria: validação de um método para uso em pesquisa

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciana de Souza Cardoso
UERGS – Depto. Botânica

Dra. Magali da Silva Rodrigues
UFRGS – Centro de Ecologia

Dra. Maria Teresa Raya-Rodriguez
UFRGS – Centro de Ecologia

Dedico este trabalho aos meus pais, Guaracy e Nara, que nunca mediram esforços para cuidar de seus filhos e prepará-los para o mundo.

Agradecimentos

Agradeço a professora orientadora, Maria Teresa Raya-Rodriguez, pela disponibilidade e amistosidade ao longo de todo o trabalho.

Agradeço à Cíntia Pinheiro pelo apoio e suporte laboratorial, facilitando o trabalho sempre que possível e criticando sempre que necessário.

Agradeço aos colegas de laboratório Arthur Oliveira, Letícia Rafaelli e Aline Fachinni pelo companheirismo e pelas várias discussões teóricas.

Agradeço a Veridiana Lima pelo auxílio no uso (correto) do espectrofotômetro.

Agradeço aos meus vários colegas de curso pela amizade que tornou tudo muito mais divertido nesses últimos 5 anos.

Agradeço aos meus vários professores do curso (e fora dele) pelo conhecimento e pelas provações que colocaram na minha frente.

E agradeço, principalmente, aos meus pais, pelas lições e por todo o amor que me deram.

“O que não me mata me deixa mais forte”

Nietzsche

Resumo

A pesquisa em cianobactérias é intensa e tem progredido muito com o desenvolvimento de novas tecnologias e técnicas. Em projetos envolvendo culturas de cianobactérias, sua quantificação precisa e exata é imprescindível, pois diversos aspectos de sua biologia dependem de sua densidade celular. Neste trabalho estabeleceu-se um método espectrofotométrico de contagem rápida e eficiente, para ser aplicado a culturas da cianobactéria tóxica *Microcystis aeruginosa*, da cepa brasileira NPLJ-4, para uso em pesquisa. No espectrofotômetro de UV Cary-1E foram feitas medições de absorbância no pico de absorção da amostra, determinado experimentalmente a 436nm. A matriz utilizada (branco) foi o meio de cultura ASM-1, uma solução de 0,4% de diferentes sais. As absorbâncias foram correlacionadas com os resultados de contagens de células em câmara de Sedgwick-Rafter, em diferentes faixas de trabalho, tanto em análises de correlação linear como de potência. A avaliação dos resultados foi realizada através de gráficos de perfil de resíduos, que demonstram se há tendência nas previsões das equações geradas em cada correlação. A regressão linear, quando separada em altas e baixas concentrações celulares, mostrou-se a mais precisa. As equações de regressão $x = (y/4.10^{-8}) - 0,0357$ e $x = (y/7.10^{-8}) + 0,0012$ mostram qual é o número esperado de células, em altas e baixas concentrações (respectivamente), para uma absorbância y . A equação na faixa de altas concentrações deve ser utilizada para densidades acima de $1.230.000 \text{ células.mL}^{-1}$, o que equivale a um valor de absorbância 0,0850, sendo valores de concentração celular e absorbância mais baixos melhor preditos pela equação de baixas concentrações. Também foram determinados os limites de detecção e quantificação do novo método. Os resultados esperados pelas equações e observados nas contagens foram avaliados através de um teste F, que mostrou

que as variâncias não diferem ($F_{\text{calc}}=1,90 < F_{0,05;6;6}=5,82$ para os resultados das equações de maiores concentrações e $F_{\text{calc}}=1,68 < F_{0,05;6;6}=5,82$ para os resultados das equações de menores concentrações). Conclui-se que os resultados esperados das equações são similares aos resultados das contagens, comprovando que o novo método está validado e pode ser aplicado eficientemente. Este método, apesar de estar restrito a apenas uma linhagem tóxica, é muito mais ágil do que o método de quantificação em câmara de Sedgwick-Rafter, mostrando-se muito promissor e de grande utilidade para a pesquisa.

Palavras-chave: Quantificação, NPLJ-4, contagem de células, Sedgewick-Rafter, meio de cultura.

Abstract

Research in cyanobacteria is intense, and has progressed much with the development of new technologies and techniques. In projects involving cyanobacteria cultures, its precise quantification is paramount, since several aspects of its biology rely on cellular density. In this work, a fast and precise spectrophotometric cell quantification method has been established, to be applied in research using cultures of the toxic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, of the Brazilian cell line NPLJ-4. Absorbance readings using the Cary-1E UV spectrophotometer were made in the sample's absorption peak, empirically determined at 436nm. The culture medium ASM-1, which is a solution of 0,4% different salts, was used as the matrix (blank). Absorbance values were correlated to Sedgewick-Rafter chamber cell counting results, in different work ranges, in both linear and power correlation analysis. Results were analyzed through residues profile charts, which reveals any bias on the predictions of the correlation equations. Linear regression, when separated in high and low cell densities, was found to be more accurate. The regression equations $x = (y/4 \cdot 10^{-8}) - 0,0357$ and $x = (y/7 \cdot 10^{-8}) + 0,0012$ show the expected cell number in high and low cellular concentrations (respectively), for a y absorbance. The high cellular concentration equation should be used for cellular densities above 1.230.000 cells.mL⁻¹, which reflects an absorbance value of 0,0850, being lower cellular concentrations and absorbance values better fit for the low cellular concentration equation. Quantification and detection limits were also determined for the new method. The results obtained from counting chamber were compared to the results expected by the different equations using a F test, which has shown that variances were not different ($F_{\text{calc}}=1,90 < F_{0,05;6;6}=5,82$ for high concentrations equation results and $F_{\text{calc}}=1,68 < F_{0,05;6;6}=5,82$ for low concentration equation results). It has been

concluded that the expected results from the equations are similar to the results of the countings, showing that the new method may be efficiently applied and it's validated. Although being restricted to a single toxic cell line, the new method is much faster than the Sedgwick-Rafter chamber cell counting method, and therefore is very promising and has great uses for research.

Keywords: Quantification, NPLJ-4, cell counting, Sedgwick-Rafter, culture medium.

Lista de figuras

- Figura 1 : Varredura dos picos de absorvância do cultivo concentrado de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 realizado pelo programa Scan 3.00(182), mostrando a absorvância registrada para cada comprimento de onda, com os picos destacados.....31
- Figura 2: Análise de correlação linear entre as 7 maiores (a), 7 menores (b) e de todas (c) as concentrações estudadas, com equação de correlação mostrando qual é a absorvância esperada para um dado número de células.....33
- Figura 3: Análise de correlação de potência entre as 7 maiores (a), 7 menores (b) e de todas (c) as concentrações celulares estudadas, com o número de células transformado em logaritmo, com a equação de correlação mostrando qual é a absorvância esperada para um dado logaritmo de número de células.....34
- Figura 4: Perfil de resíduos entre as equações lineares de 7 maiores (a), 7 menores (b) e todas (c) as concentrações celulares estudadas.....35
- Figura 5: Perfil de resíduos entre as equações potência de 7 maiores (a), 7 menores (b) e todas (c) as concentrações celulares estudadas.....36

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas no meio de cultura ASM-1.....	23
Tabela 2: Média das absorvâncias e contagens celulares, em números absolutos e logarítmicos, para cada amostra.....	32
Tabela 3: Número esperado de células para cada amostra utilizando as equações de maiores e menores concentrações.....	50
Tabela A1: Contagem do número de células para cada réplica (a, b e c).....	49
Tabela A2: Absorvâncias para cada réplica e média da absorvância Cada uma das réplicas já é a média dos 5 registros de absorvância que são realizadas pelo espectrofotômetro a cada leitura.....	50
Tabela A3: Resíduos calculados para cada equação de correlação linear.....	50
Tabela A4: Resíduos calculados para cada equação de correlação de potência.....	51
Tabela A5: Absorvâncias obtidas para determinação do limite de detecção e limite de quantificação.....	51
Tabela A6: Densidades celulares, transformadas em logaritmo, que foram utilizadas para o cálculo do teste F.....	52

SUMÁRIO

1 Introdução	12
1.1 Justificativa.....	12
1.2 Objetivos.....	13
2 Revisão bibliográfica	14
2.1 Eutrofização e comprometimento dos recursos hídricos.....	14
2.2 Ocorrência e efeitos das cianobactérias e cianotoxinas.....	15
2.3 Tratamento de águas contaminadas com cianobactérias e cianotoxinas.....	17
2.4 Quantificação de cianobactérias.....	19
3 Material e Métodos	23
3.1 Espécie de cianobactéria e equipamento utilizado.....	23
3.2 Métodos de Medição.....	25
3.2.1 Medidas de absorvância por espectrofotometria: método a ser validado.....	25
3.2.2 Contagem de células em câmara de Sedgwick-Rafter: método tradicional.....	27
3.3 Métodos estatísticos.....	29
3.3.1 Análise de correlação.....	29
3.3.2 Análise de resíduos de regressão.....	29
3.3.3 Análise de variância.....	30
4 Resultados	31
4.1 Determinação do pico máximo de absorvância.....	31
4.2 Determinação da absorvância e contagem de células em câmara de Sedgwick-Rafter.....	32
4.3 Análise de correlação entre os métodos testados.....	32
4.4 Perfil dos resíduos das correlações.....	34
4.5 Faixa de trabalho.....	36
4.6 Sensibilidade do método espectrofotométrico.....	38
4.7 Validação estatística do método espectrofotométrico.....	38
5 Discussão	40
6 conclusão	44
7 Sugestões para continuidade do trabalho	45
8 Referências	46
9 Apêndice: tabelas com dados brutos	49

1 Introdução

1.1 Justificativa

Cianobactérias têm grande importância ecológica e econômica, principalmente devido aos problemas que elas podem ocasionar. Os prejuízos que elas trazem à saúde pública, indústria e ao ambiente colocam esses organismos sob a constante mira de microscópios e câmeras de TV. Sua biologia e problemática foi estudada, estando junto a revisão bibliográfica.

Os efeitos da presença de cianobactérias estão sempre ligados a sua densidade celular ou biomassa no corpo d'água. No âmbito da pesquisa, isso quer dizer que praticamente qualquer estudo que seja feito considerando suas propriedades biológicas terá que quantificá-las. Infelizmente, as técnicas mais usuais para determinação da densidade celular de cianobactérias de uma amostra (quantificação por microscopia ótica) toma muito tempo, e é muito trabalhosa. Profissionais que trabalham com essa tarefa sabem das dificuldades e desafios que isso acaba gerando.

Utilizando a espectrofotometria, uma técnica de análise consagrada e de fácil aplicação, poderia desenvolver-se um novo método de quantificação de cianobactérias (de uma linhagem) para uso em pesquisa. Tal método seria capaz de poupar diversas horas de trabalho, quando comparado às análises tradicionais, para

os pesquisadores que investigam cianobactérias. O tempo e a energia poupada com o uso do novo método poderia ser direcionado para outros aspectos da investigação, como maior número de réplicas e maior número de tratamentos, resultando em trabalhos de melhor qualidade analítica, ou que simplesmente são realizados mais rapidamente.

1.2 Objetivos

Este trabalho visa elaborar e validar um método de quantificação de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 por espectrofotometria. Isso será realizado ao correlacionar medidas de absorvância em espectrofotômetro com o número de células de *Microcystis* contadas em câmara de Sedgwick-Rafter.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Eutrofização e comprometimento dos recursos hídricos.

A escassez e vulnerabilidade dos recursos hídricos no planeta têm sido um dos mais discutidos desafios da humanidade, devido a suas enormes implicações ambientais, econômicas e sociais refletidas em todo o mundo. Apesar de apenas 0,10 a 0,15% da água do planeta ser facilmente disponível para consumo imediato (HOTLOS, 2008), é o seu desperdício e comprometimento que causa grandes preocupações (OKI e KANAE, 2006). Como as fontes de água potável ainda estão distribuídas desigualmente e têm dimensões limitadas (OKI e KANAE, 2006), é essencial que elas estejam bem preservadas pelos seus próprios usuários. Infelizmente, porém, os rios e lagos ainda são nosso principal ponto de despejo de diferentes poluentes, sendo sua entrada capaz de comprometer a biodiversidade e a usabilidade para fins antrópicos (CARPENTER *et al*, 1998; ELLIOTT e JONGE, 2002).

Dentre os efeitos da poluição das águas um dos mais problemáticos é a eutrofização (sobrecarga de um corpo hídrico com matéria orgânica), pois ela está relacionada a uma série de fatores de difícil manejo (chuvas, clima, efluentes industriais, erosão, saídas de esgotos, escoamento de lixo e resíduos, entre muitos outros). Lagos e rios eutrofizados tem seu uso e função comprometidos, devido a: crescimento desbalanceado de algas e macrófitas, hipoxia, perda de habitats, perda de biodiversidade, alteração nas teias tróficas e na reciclagem de nutrientes, entre

outros(CARPENTER *et al*, 1998; LAU e LANE, 2002). O acúmulo de N e P nas águas, provenientes principalmente excesso de fertilizantes da agricultura e esgotos domésticos de grandes cidades, é um dos maiores responsáveis por disparar fenômenos de floração de cianobactérias, que são normalmente limitadas por tais nutrientes (CARPENTER *et al*, 1998).

2.2 Ocorrência e efeitos das cianobactérias e cianotoxinas

Cianobactérias estão entre os seres mais antigos do planeta, surgindo há 3,5 bilhões de anos atrás , acumulando uma série de adaptações a diferentes ambientes (tais como reserva de nutrientes, flutuação, fixação de nitrogênio, formas de resistência, bainhas mucilaginosas, formas coloniais) (CALIJURI, 2006), de forma que hoje elas se encontrem em todo o mundo (LAHTI *et al*, 2001). Quando ocorrem em floração (altas densidades), devido principalmente ao estado eutrófico das águas, causam uma série de problemas. Entre eles se destaca o bloqueio da luz solar para as camadas inferiores do corpo d'água, a hipoxia causada pela sua decomposição e também a produção de cianotoxinas, caso alguma linhagem produtora de tais substâncias esteja em floração (CARPENTER ET AL, 1998). Florações podem apresentar diferentes linhagens de cianobacterias ocorrendo ao mesmo tempo, cada uma com um nicho que, ao todo, permite a prevalência de cianobactérias em detrimento de outras formas de fitoplâncton (CHORUS e BARTRAN, 1999). Devido principalmente as cianotoxinas, as cianobactérias podem

ser uma ameaça a saúde pública e também a de animais, domésticos ou selvagens (BETTINA *et al*, 2000).

Cianotoxinas são altamente tóxicas e potencialmente fatais. O tipo de cianotoxina produzida depende tanto da espécie como da linhagem, sendo que várias linhagens podem produzir um tipo de toxina e uma linhagem pode produzir vários tipos de toxinas. A microcistina-LR, produzida por *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4, é a cianotoxina mais comum e também uma das mais tóxicas. Essa toxina apresenta propriedades hepatotóxicas, imunotóxicas, genotóxicas, citotóxicas, e embriotóxicas. A DL50 da microcistina varia bastante para cada uma de suas mais de 60 variações, e a DL50 intravenosa para a microcistina produzida por *M. aeruginosa* NPLJ-4 é de 24,2 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ p.c. (KURODA 2007).

A microcistina age inibindo as subunidades catalíticas das fosfatases-1 e -2A ligando-se a cisteína-273 e cisteína-266, respectivamente (BETTINA *et al*, 2000). A interferência sobre a regulação enzimática da célula age de forma mais direta no citoesqueleto, principalmente no fígado, por hiperfosforilação de proteínas dos filamentos intermediários (FALCONER, 2008). Como resultado, o ciclo celular fica irregular (acelera multiplicação, agindo como fator de risco de câncer, induz a apoptose e necrose) e ocorre perda de aderência celular (os vasos sanguíneos se perdem entre os hepatócitos soltos, causando hemorragia, que acumula sangue, no órgão). Hepatócitos também podem se desprender do fígado e entrar na circulação (SANTOS e BRACARENSE, 2008).

Esta toxina possui uma estrutura química incomum, com aminoácidos raros e D-aminoácidos, sendo uma molécula muito resistente a estímulos térmicos, reagentes químicos e de longa meia-vida. Ela é detectável na água mesmo após o seu tratamento, na rede de distribuição, podendo causar muitos problemas de saúde. Sua efetiva remoção gera elevados gastos. Ainda é desconhecido o efeito do consumo contínuo ao longo dos anos de resíduos e traços de microcistina e subprodutos de sua degradação sobre a população humana (BETTINA *et al*, 2000).

Foi registrado um caso grave de intoxicação em 1996, onde 50 pessoas morreram e outras 51 tiveram graves lesões no fígado em uma clínica de hemodiálise de Caruaru, Brasil. Os pacientes foram expostos, de forma intravenal, a água contaminada com uma concentração de cianotoxinas de $19,5 \mu\text{gL}^{-1}$ (JOCHIMSEN, 1998; CARMICHAEL *et al*, 2001), tendo sintomas como problemas de visão, náuseas, vômitos, dores de cabeça, fraqueza muscular, dores epigástricas, confusão mental, sangramento, febre e ataques epiléticos (PILOTTO, 2008). Ainda existem casos graves de envenenamento com cianotoxinas registrados, desde 1930, nos EUA, Canadá, Austrália, China, Áustria e muitos outros (CHORUS E BARTRAM, 1999; PILOTTO, 2008).

2.3 Tratamento de águas contaminadas com cianobactérias e cianotoxinas.

Os níveis máximos de concentração de cianotoxinas para consumo de água e balneabilidade, de acordo a Organização Mundial de Saúde, são de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e de 10

$\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente (CHORUS e BARTRAN, 1999). Apesar da aceitação desse valor-guia, o monitoramento da ocorrência de microcistinas na água não se dá diretamente pela análise de concentração de microcistinas. Usualmente, é o número de células. mL^{-1} que serve de alerta para a tomada de ação dos órgãos responsáveis pelo abastecimento de água. A portaria 518/04 define a frequência dos monitoramentos em razão do tamanho da população atendida e da densidade de cianobactérias encontradas em cada análise. A partir da detecção de 20.000 células. mL^{-1} , ações especiais são tomadas nas estações de tratamento, para evitar o envenenamento da população por cianotoxinas (BRASIL, 2004). Uma das soluções para o problema da presença de cianobactérias na água tratada das cidades é a adição de reagentes químicos, como sulfato de cobre. Esse reagente químico amplamente utilizado pode causar lise da parede bacteriana, e assim libera as cianotoxinas que estão dentro da célula. Após a utilização deste reagente químico, as concentrações de cianotoxinas aumentam muito e em pouco tempo, havendo registros de até 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cianotoxinas na água (SAKAI *et al*, 2007). Sua aplicação já causou problemas sérios em Palm Island, Austrália, onde 138 crianças foram contaminadas por cianotoxinas em 1980, pois o algicida lisou as células de uma floração e liberou as toxinas (FALCONER, 2008). No Brasil, seu uso é vetado pela portaria 518/04 (BRASIL, 2004).

Tratamentos alternativos são necessários para se reduzir as concentrações de cianotoxinas em si, como adição com carvão ativado ou cloração (LAHTI *et al*, 2001). A cloração tem uma eficiência bastante variável (e muitas vezes insatisfatória), dependendo das condições da água e da estação de tratamento. De qualquer forma, é um dos processos mais utilizados para tratamento de água,

mesmo podendo gerar subprodutos indesejáveis ao reagir com as cianotoxinas (BETTINA *et al*, 2000). Algumas estações de tratamento de água que usam essas técnicas conseguem remover tanto as cianobactérias como as cianotoxinas para abaixo dos níveis máximos sugeridos (LAHTI *et al*,2001). Porém, como os procedimentos de tratamento (e sua eficiência) variam muito de estação para estação (WESTRICK, 2008) é comum que muitas estações não consigam eliminar as cianotoxinas com os métodos tradicionais de forma satisfatória (BETTINA *et al*, 2000). A ocorrência de florações intensas também podem sobrecarregar os sistemas de tratamento em geral eficientes, de tal forma que células inteiras e cianotoxinas são encontradas na água já tratada.

A radiação UV já foi testada como removedora de cianotoxinas, possuindo diferentes graus de eficiência. (TSUJI *et al*, 1995; WENDELL e DAN, 2004). Ao contrario da maioria dos tratamentos químicos, o UV não deixa resíduos nocivos detectáveis na água (TSUJI, 1995). Sua eficiência na destruição de cianotoxinas já levou algumas estações de tratamento de água a utilizar o ultravioleta entre seus processos rotineiros de higienização da água (LAHTI *et al*, 2001), apesar da viabilidade econômica do processo ainda estar em amplo debate (TSUJI *et al*, 1995; WESTRICK, 2008; WENDELL e DAN, 2004;, SAKAI *et al*, 2007).

2.4 Quantificação de cianobactérias

Em estudos de cianobactérias, a quantificação do número de células em uma amostra qualquer é fundamental. Existe uma diversidade de técnicas que variam em eficiência, custo e agilidade.

Usualmente, a técnica utilizada para quantificação de cianobactérias é por câmaras de contagem em microscopia ótica, um processo trabalhoso que demanda várias horas e pessoal qualificado (VALER e GLOCK, 1998). Câmaras de contagem, como a de Sedgwick-Rafter ou de Utermöhl, são amplamente utilizadas pelos profissionais da área, por terem sido desenvolvidas especificamente para quantificação de fitoplâncton. Ambas baseiam-se na contagem de indivíduos por um número de campos observados, com dimensões estritamente definidas, em relação a área total da câmara e o volume da amostra (CETESB, 2005). A maior diferença entre essas técnicas é que a câmara de Sedgwick-Rafter comporta apenas 1 mL de amostra, enquanto a técnica de Utermöhl comporta até 100mL de amostra, por conte-la dentro de uma coluna d'água com alguns centímetros de altura (o que restringe seu uso a microscópios invertidos). A técnica de Utermöhl precisa, porém, de várias horas de sedimentação do material que será analisado, enquanto a câmara de Sedgwick-Rafter está pronta para uso em 15 minutos (APHA, 2001). Essa técnica costuma ser utilizada apenas quando a amostra é composta de organismos muito frágeis e em baixa densidade – de tal forma que não são satisfatoriamente quantificados em apenas 1 mL e não podem ser concentrados por centrifugação, que danifica algumas células (CETESB, 2005). Mesmo assim, qualquer técnica ou equipamento capaz de determinar um número de células por unidade de área (como um hematócrito), poderia ser utilizada para quantificação de cianobactérias, desde que seja calibrada e considere o tempo de sedimentação das

células. Praticamente qualquer amostra de fitoplâncton pode ser quantificada por microscopia ótica, e ela apresenta um custo muito baixo. Sua maior desvantagem é o tempo necessário para cada análise e a subjetividade (sujeito a perícia do analista).

Uma forma mais avançada de quantificação e detecção de cianobactérias, especialmente as tóxicas, é por quantificação via PCR em tempo real (PIMENTEL e GIANI, 2009) e competitivo (BARROS e OLIVEIRA, 2009). Estas técnicas se baseiam no número de cópias dos genes responsáveis pela produção de cianotoxinas para determinar o número de células na amostra. Elas são muito precisas, específicas para um tipo determinado de toxina e conseguem detectar quantidades mínimas de cianobactérias utilizando volumes amostrais muito pequenos. Os reagentes químicos utilizados, porém, tem custo elevado, assim como o equipamento utilizado para realizar as análises.

Uma das alternativas utilizadas para agilizar o trabalho mantendo a eficiência e baixo custo é utilizar métodos espectrofotométricos. Pode-se medir a quantidade de cianobactérias por inferência de biomassa, através da quantificação de clorofila *a*. Análises de clorofila são práticas comuns em diversos laboratórios, mas não conseguem representar diretamente o número de células, pois o conteúdo de clorofila *a* por célula varia, mesmo dentro da mesma linhagem (CHORUS e BARTRAN, 1999). Mesmo assim, medidas de biomassa são perfeitamente confiáveis para quantificação de organismos de uma amostra. É um método rápido e barato, mas são necessários muitos cuidados no manuseio das amostras a serem analisadas. Pequenos erros metodológicos podem levar a resultados bastante

alterados, levando inclusive a conclusões erradas (APHA, 2001; CALIJURI, 2006). A alta degradação da clorofila devido a erros metodológicos pode ser interpretado como baixa biomassa, ou que a amostra analisada estava em fase senescente (CHORUS e BARTRAN, 1999).

Para se obter diretamente o número de células pela espectrofotometria, pode-se fazer uma comparação entre as medidas de absorvâncias para um determinado tipo de cianobactéria (de preferência uma linhagem isolada) e a quantificação, da mesma amostra, por outros métodos. Essa comparação pode resultar em uma equação de regressão que irá predizer o número de células em uma amostra com base apenas na sua absorvância. A maior vantagem do uso da espectrofotometria para quantificação de cianobactérias é a agilidade e rapidez da obtenção de resultados – em 60 minutos de trabalho no espectrofotômetro consegue-se fazer o trabalho de uma semana inteira de contagens em microscópio. Deve-se ter cuidado na realização das medidas de absorvância, pois pequenos erros de amostragem ou de manipulação dos aparelhos e das amostras podem dar resultados falsos. Além disso, diferentes modelos de espectrofotômetros podem apresentar diferenças significativas nas leituras das amostras (VALER e GLOCK, 1998). Existe a necessidade de determinar, de forma empírica, o pico de absorção da amostra com cianobactérias para cada equação de regressão correspondente (RODRIGUES, 2002). Também é importante se obter os limites de detecção, para não haver confirmação de dados que não poderiam ser utilizados (RODRIGUES, 2002). Um método como esse é muito ágil e barato, mas pouco abrangente, uma vez que cada linhagem de cianobactéria pode ter medidas de absorção diferentes e, portanto, responde de forma diferente as equações estabelecidas para outras linhagens.

3 Material e métodos

3.1 Espécie de cianobactéria e equipamento utilizado

A espécie utilizada foi *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4, isolada no Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia de Cianobactérias da Universidade Federal do Rio de Janeiro. São algas tóxicas, produtoras de microcistina-LR (KURODA, 2007). As algas foram cultivadas no meio ASM-1, que consiste das soluções descritas na tabela 1.

Tabela 1: Composição das soluções utilizadas no meio de cultura ASM-1.

Solução "A":	
Composto	Concentração
NaNO ₃	8,5 g.L⁻¹
MgCl ₂ .6H ₂ O	2,05 g⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	2,45 g.L⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,45 g.L⁻¹
CaCl ₂	1,1 g.L⁻¹
Solução "B":	
K ₂ H ₂ PO ₄ .3H ₂ O	8,7 g.L⁻¹
NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	12,3 g.L⁻¹

Solução "C"	
H ₃ BO ₃	24,8 g.L⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O	13,9 g.L⁻¹
FeCl ₃ .6H ₂ O	10,8 g.L⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	7,07 g.L⁻¹
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,19 g.L⁻¹
Solução "D"	
EDTA.Na ₂	18,6 g.L⁻¹

O meio deve conter as soluções nas seguintes proporções: 20 mL de solução A, 2 mL de solução B, 0,1 mL de solução C e 0,4 mL de solução D, completando para 1L de água destilada (FERREIRA, 2006). As algas eram mantidas a 25°C, em fotoperíodo 14/10.

Para a contagem em câmara de Sedgwick-Rafter, foi utilizada uma câmara de plástico, marca Graticules, que possuía campos delimitados com 1 mm² de área. Havia 20 linhas e 50 colunas de campos, totalizando 1000 campos em 10cm². A borda da câmara possuía 1 mm de altura e ao total comportava 1mL de amostra. Todas as amostras para contagem foram preservadas em 6,6% de Lugol forte (5%I, 10%KI).

Para a observação das células utilizou-se o microscópio H 500, da marca Hund, em aumento de 10X10 com o diafragma totalmente fechado e alta intensidade luminosa, para se obter um alto contraste das paredes celulares das algas. Utilizou-

se o contador H 102, marca Kori Seiki, para se registrar o número de células a cada amostra.

Para as medidas de absorvância utilizou-se o espectrofotômetro de feixe duplo Cary 1E Winuv, marca Varian, devidamente calibrado. Para as leituras, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho de luz da amostra e 1mm de espessura. O espectrofotômetro estava ligado a um computador, que executava os programas Advanced Reads e Scan, versão 3.00(182) para a análise das amostras. Todos os dados obtidos foram tabelados e calculados no software Microsoft Excel 2007.

3.2 Métodos de Medição

3.2.1 Medidas de absorvância por espectrofotometria: método a ser validado

Para se detectar o pico de absorvância, o meio de cultura com algas (cultivo) foi centrifugado para aumentar sua concentração, pois em concentrações de até 10 milhões de células.mL⁻¹ o espectrofotômetro não apontava os picos de absorção da amostra. Foi centrifugado 200mL do meio a 2500 rpm por 20 minutos e 180mL do sobrenadante foram desprezados, concentrando a amostra 10x em um volume final de 20 mL (CETESB, 2005). Uma vez que a amostra estava em alta concentração, o espectrofotômetro, através do programa Scan, varreu os comprimentos de onda de

800 a 200 nm, medindo absorvância a cada um desses comprimentos de onda, gerando um gráfico. Depois de determinado o comprimento de onda de máxima absorvância do cultivo de algas, diluições do cultivo foram feitas para se obter diferentes pontos na curva de calibração do método. O branco utilizado era o meio de cultura ASM-1, autoclavado, límpido, sem as algas e armazenado a 4°C.

Utilizando o meio de cultura em alta densidade celular, foi feita uma diluição seriada de aproximadamente 30% para 13 pontos. Cada uma das diluições tinha um volume de 20mL. Todas as amostras eram vigorosamente homogeneizadas antes de serem inseridas dentro das cubetas de quartzo para a leitura das absorvâncias. Todas as leituras foram feitas a temperatura ambiente, com a mesma cubeta, e a cubeta do branco constantemente era homogeneizada para prevenir a formação de bolhas de ar. Em todas as análises, as cubetas eram aclimatadas. Todas as amostras eram lidas em triplicata, removendo e adicionando novamente a amostra dentro da cubeta a cada vez. Em cada uma das leituras, o espectrofotômetro media 5 vezes a absorvância, totalizando 15 registros de absorvância para cada amostra em menos de 1 minuto.

Todo o material utilizado era descartado em bombonas específicas para ser encaminhado à Central de Resíduos da UFRGS, pois se tratava de algas tóxicas que não podem ser descartadas sem critério.

Foram determinados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do novo método. O LD representa o primeiro sinal analítico após o ruído do aparelho. Valores acima do limite de detecção terão 99% de chance de ter uma densidade celular

maior do que zero (INMETRO, 2007; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). O LD obtêm-se fazendo sete leituras da absorvância do branco, no comprimento de onda a serem feitas as análises. As cubetas são preenchidas, lidas e esvaziadas sete vezes com o meio de cultura, e a absorvância é registrada. O LD fica sendo igual a média de absorvância mais 3 desvios padrão (INMETRO, 2007).

O LQ é estabelecido com base no LD e depois é verificado empiricamente. O LQ esperado é igual a média da absorvância do meio de cultura mais dez desvios padrão (INMETRO, 2007). Para ser verificado empiricamente, um pequena quantidade do cultivo foi adicionada ao meio de cultura sem células, e a absorvância foi então verificada. No momento em que se chega a absorvância desejada (próximo ao LQ esperado), se fazem sete leituras dessa amostra e ela também é fixada em Lugol para contagem. Neste trabalho, as amostras de menores concentrações foram utilizadas para verificação empírica do LQ.

3.2.2 Contagem de células em câmara de Sedgwick-Rafter: método tradicional

Todas as amostras para contagem eram imediatamente retiradas das soluções analisadas no espectrofotômetro e armazenadas tubos de eppendorf 1,5mL com 0,1mL de Lugol. As amostras preservadas foram mantidas fechadas em local seco e escuro.

Todas as contagens foram feitas em triplicata. Antes do preenchimento da câmara de contagem, as amostras eram vigorosamente homogeneizadas e aplicada na câmara em uma superfície plana, certificando-se de que não haviam bolhas de ar dentro da câmara após a vedação com a lâmina superior. Havia necessidade de esperar a sedimentação completa das células, que levava pelo menos uma hora.

A linhagem utilizada não forma colônias, então eram contadas células individuais, e aquelas em divisão eram consideradas como duas células. Em todas as amostras, exceto as de menor concentração, foram contadas ao menos 1000 células, para um erro aproximado de 6%, de acordo a fórmula de erro estabelecida para contagens nessas câmaras ($erro = (2 \div \sqrt{n \text{ campos}}) \times 100$) com intervalo de confiança de 95% (CETESB, 2005; APHA, 2001). A amostra 12 (utilizada na determinação do LQ) devido à baixa densidade celular, teve apenas 400 células contadas, para um erro aproximado de 10%. A amostra 13 tinha uma densidade celular ainda menor, e cerca de 220 células foram contadas em cada réplica, para um erro de 13%. Como havia mais de 10 células por campo, em todas as amostras, os campos eram escolhidos aleatoriamente.

Para se chegar à densidade celular da amostra original, o número de células contadas é dividido pelo número de campos em que estavam as 1000 células, multiplicado pelo fator de diluição da amostra (necessário para amostras de altas densidades) e então multiplicado por 1000 (número de quadrículas) (APHA, 2001). Como as amostras estavam fixadas em 6,6% de Lugol, o resultado final ainda era multiplicado por 1,066, para refletir a densidade celular que foi efetivamente medida pelo espectrofotômetro antes da adição do Lugol.

3.3 Métodos estatísticos

3.3.1 Análise de correlação

Diferentes análises de correlação foram feitas para determinação de uma equação de regressão entre o número de células contadas pelo método tradicional e a absorvância determinada pelo método espectrofotométrico que fosse satisfatoriamente precisa. Foram feitas correlações lineares e de potência, considerando todos os pontos analisados e também separando as maiores e menores concentrações celulares. Nas análises de potência, o número de células foi transformado em logaritmo de base 10.

Em todas as análises, a absorvância foi mantida no eixo Y, como variável dependente do número de células, que ficava no eixo X. O resultado das equações de regressão, demonstram qual a absorvância esperada para um determinado número de células. Para que as equações sejam utilizadas na determinação do número de células, o valor X era isolado, para então a absorvância ser diretamente inserida nas equações.

3.3.2 Análise de resíduos de regressão

O gráfico do perfil de resíduos de regressão foi montado subtraindo os valores de absorvância observados pela absorvância dos valores esperados para cada função descrita na correlação de células.mL⁻¹ por absorvância. Avaliou-se a correlação linear entre os pontos obtidos para verificar a existência de alguma tendência a subestimar ou superestimar o valor de absorvância (RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

3.3.3 Análise de variância

Para averiguar se o novo método é equivalente ao método de contagem em câmara de Sedgwick-Rafter, aplicou-se um teste F bilateral para as variâncias entre as médias dos resultados das contagens e as médias dos resultados esperados pelas equações de correlação. Utilizou-se um índice de confiança de 95% com 6 graus de liberdade para ambos os grupos (INMETRO, 2007). O número de células foi transformado em logaritmo de base 10 para facilitar as comparações entre altas e baixas densidades.

4 Resultados

4.1 Determinação do pico máximo de absorvância

O programa Scan 3.00(182) do espectrofotômetro Cary-win UV detectou como sendo em 436nm o pico máximo de absorvância da amostra concentrada de cultivo algal (figura 1). Todas as leituras de absorvância foram feitas com esse comprimento de onda.

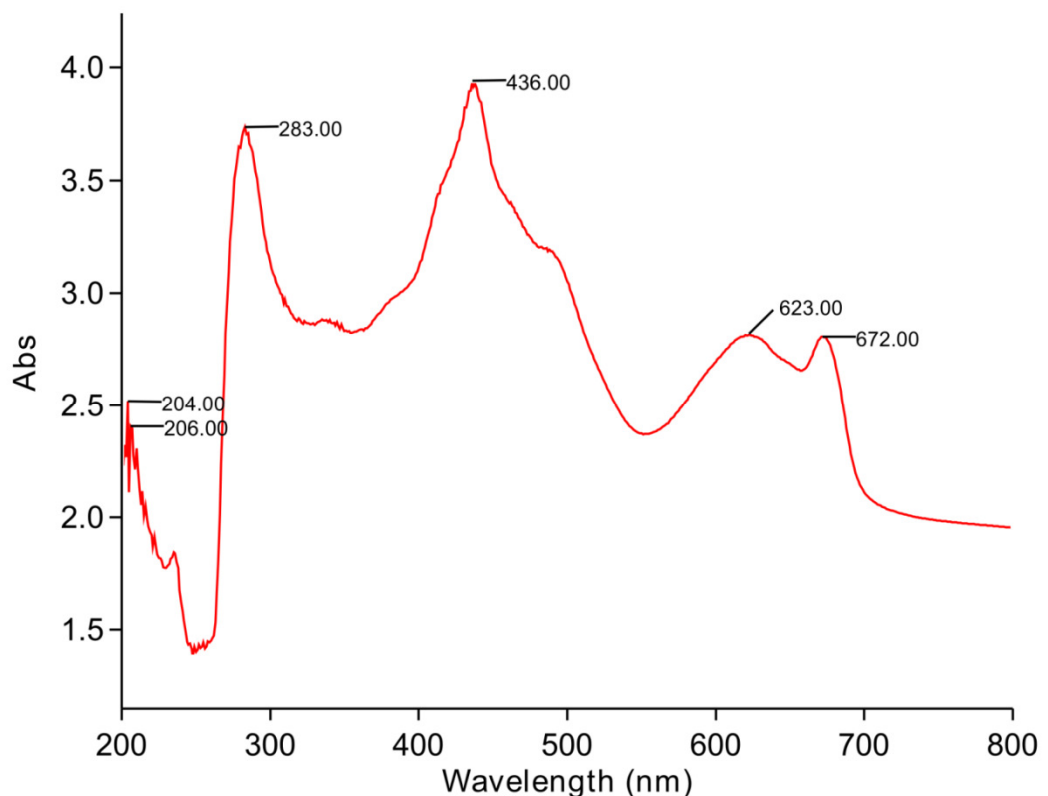


Figura 1: Varredura dos picos de absorvância do cultivo concentrado de *Microcystis aeruginosa* NPLJ-4 realizado pelo programa Scan 3.00(182), mostrando a absorvância registrada para cada comprimento de onda, com os picos destacados.

4.2 Determinação da absorvância e contagem de células em câmara de Sedgwick-Rafter.

As médias das triplicatas de leituras de absorvância e de contagens em câmara de Sedgwick-Rafter estão na tabela 2. Os resultados brutos das contagens e leituras de absorvâncias individuais estão no apêndice, tabelas A1 e A2, respectivamente.

Tabela 2: Média das absorvâncias e contagens celulares, em números absolutos e logarítmicos, para cada amostra.

Amostra	Media abs	Média n cel.mL ⁻¹	Média Log n cel.mL ⁻¹
1	0,4570	10.907.367	7,04
2	0,3104	7.154.157	6,85
3	0,2064	3.896.764	6,59
4	0,1381	1.994.604	6,30
5	0,0932	1.644.686	6,22
6	0,0619	900.304	5,95
7	0,0417	589.676	5,77
8	0,0276	402.928	5,61
9	0,0189	308.207	5,49
10	0,0120	219.584	5,34
11	0,0035	81.512	4,91
12	0,0020	21.533	4,33
13	0,0012	13.775	4,14

4.3 Análise de correlação entre os métodos testados

As equações obtidas, geradas por gráfico, mostram qual seriam as absorvâncias esperadas para um determinado número de células.mL⁻¹, para as

correlações lineares (figura 2) ou $\log n \text{ cel.mL}^{-1}$ para as correlações em função potência (figura 3). Nas diferentes equações se consideram aqueles de maiores (a), menores (b) ou com todas (c) as concentrações celulares avaliadas. Todas as correlações obtidas foram bastante altas. A análise de perfil de resíduos permite a escolha de um modelo matemático sobre o outro.

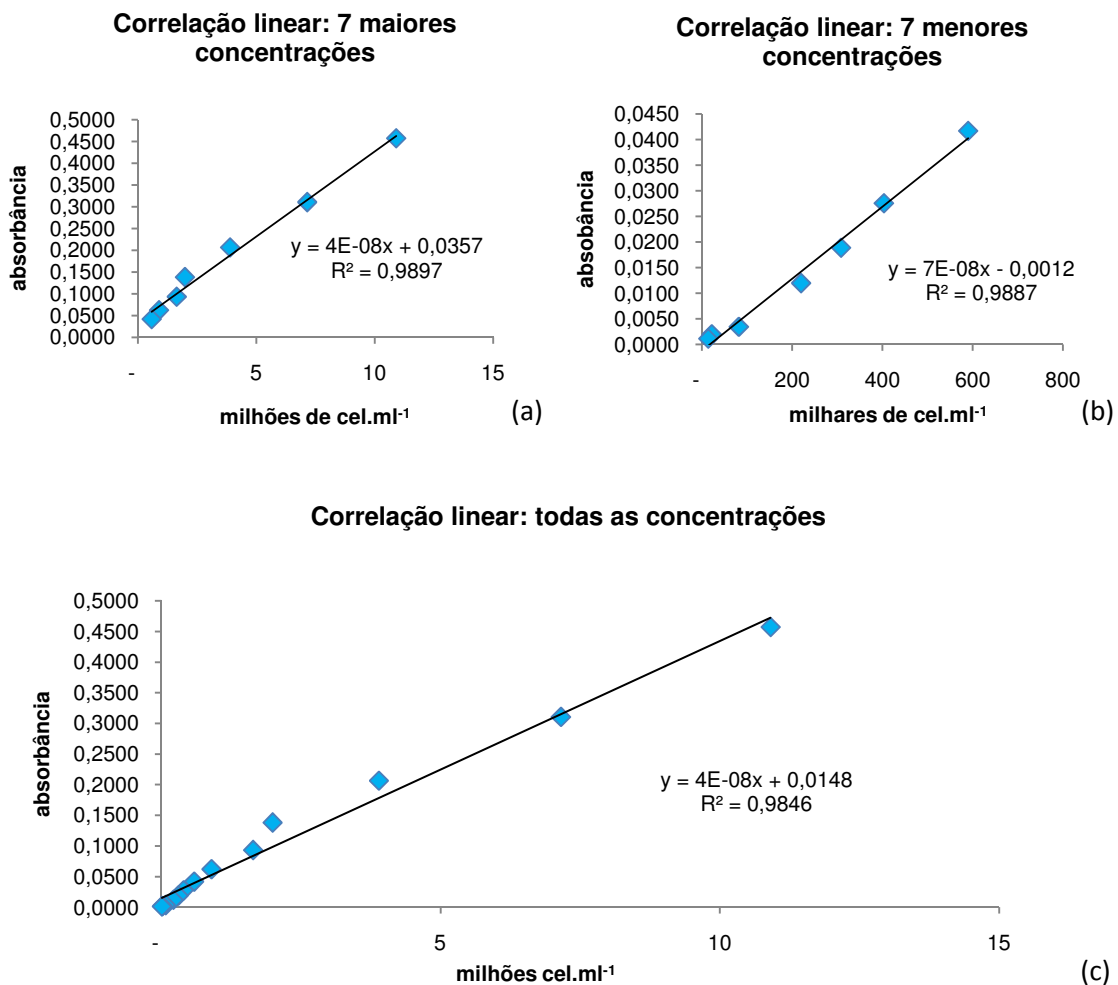


Figura 2: Análise de correlação linear entre as 7 maiores (a), 7 menores (b) e de todas (c) as concentrações estudadas, com equação de correlação mostrando qual é a absorbância esperada para um dado número de células.

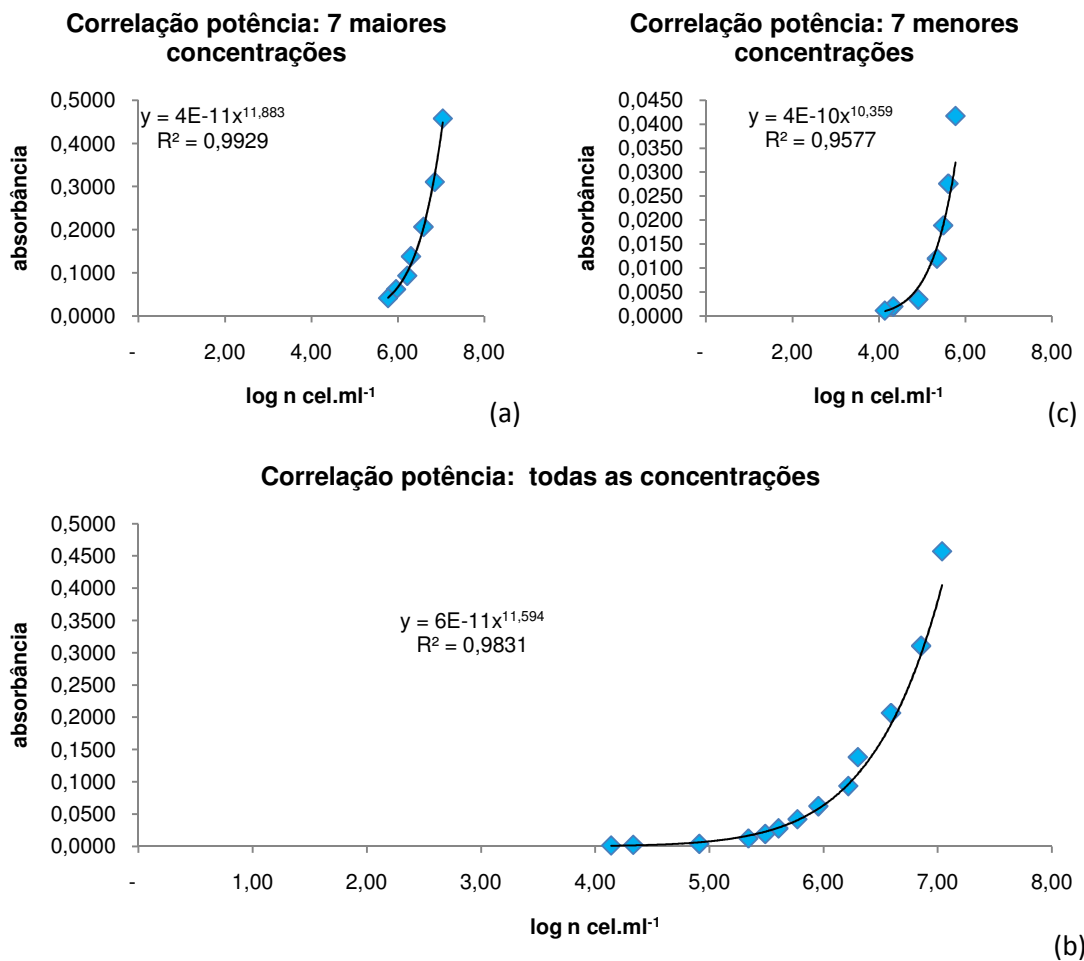


Figura 3: Análise de correlação de potência entre as 7 maiores (a), 7 menores (b) e de todas (c) as concentrações celulares estudadas, tendo o número de células transformado em logaritmo, com a equação de correlação mostrando qual é a absorbância esperada para um dado logaritmo de número de células

4.4 Perfil dos resíduos das correlações

Cada uma das equações de correlação responde de forma diferente quanto as absorbâncias esperadas para um dado número de células. Assim, há um gráfico de perfil de resíduos diferente para cada equação de correlação, onde um mesmo valor x inserido retorna diferentes resultados. As correlações lineares apresentaram as menores tendências (figura 4), sendo baixas nas maiores (a) e menores (b)

concentrações, enquanto a equação que considera todos os pontos simultaneamente (c) mostrou uma correlação mais pronunciada. As correlações de potência (figura 5) tinham uma tendência mais intensa nas maiores (a), menores (b) e mesmo quando foram consideradas todas (c) as concentrações celulares observadas. Isso ocorreu devido a baixa aleatoriedade em torno do valor $y=0$ e presença sistemática dos pontos ou acima ou abaixo do valor $y=0$.

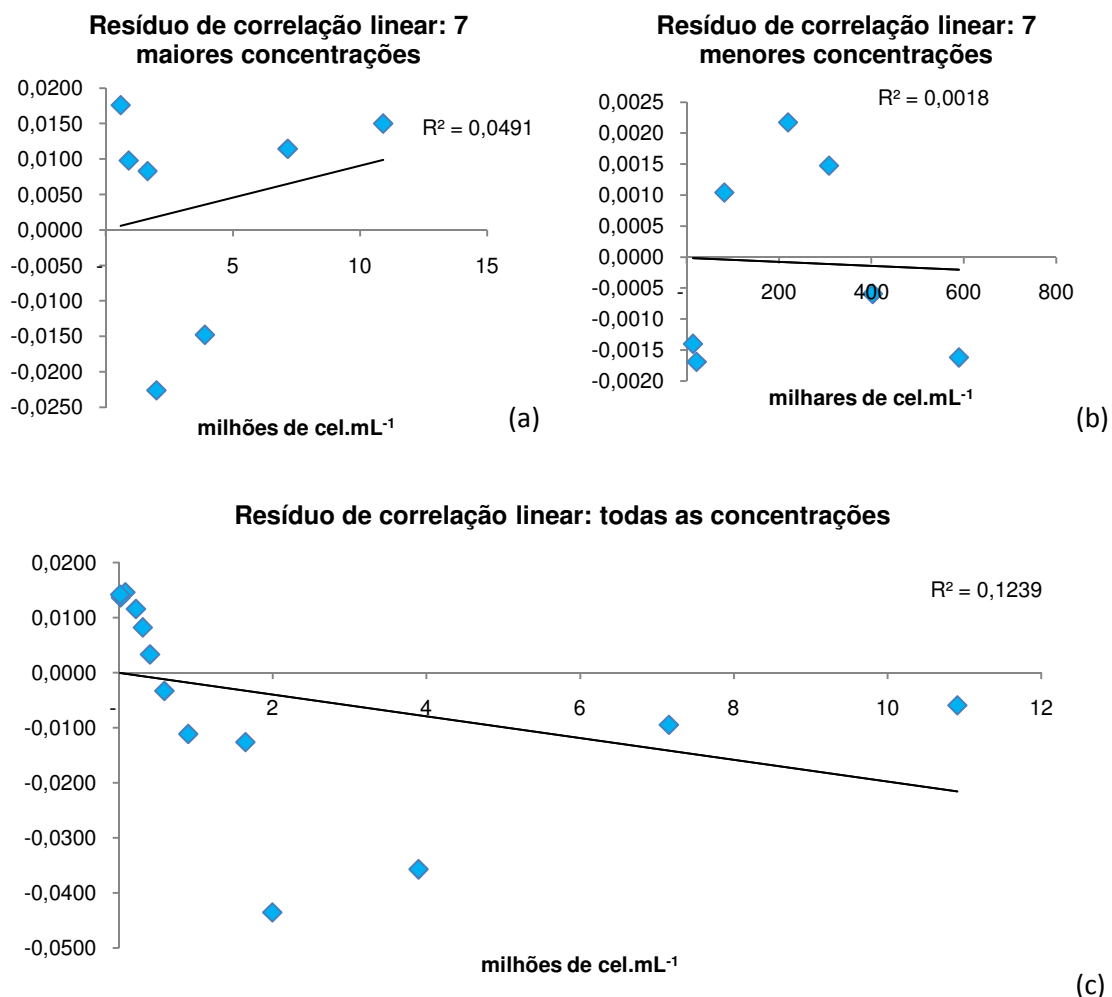


Figura 4: Perfil de resíduos entre as equações lineares de 7 maiores (a), 7 menores (b) e todas (c) as concentrações celulares estudadas.

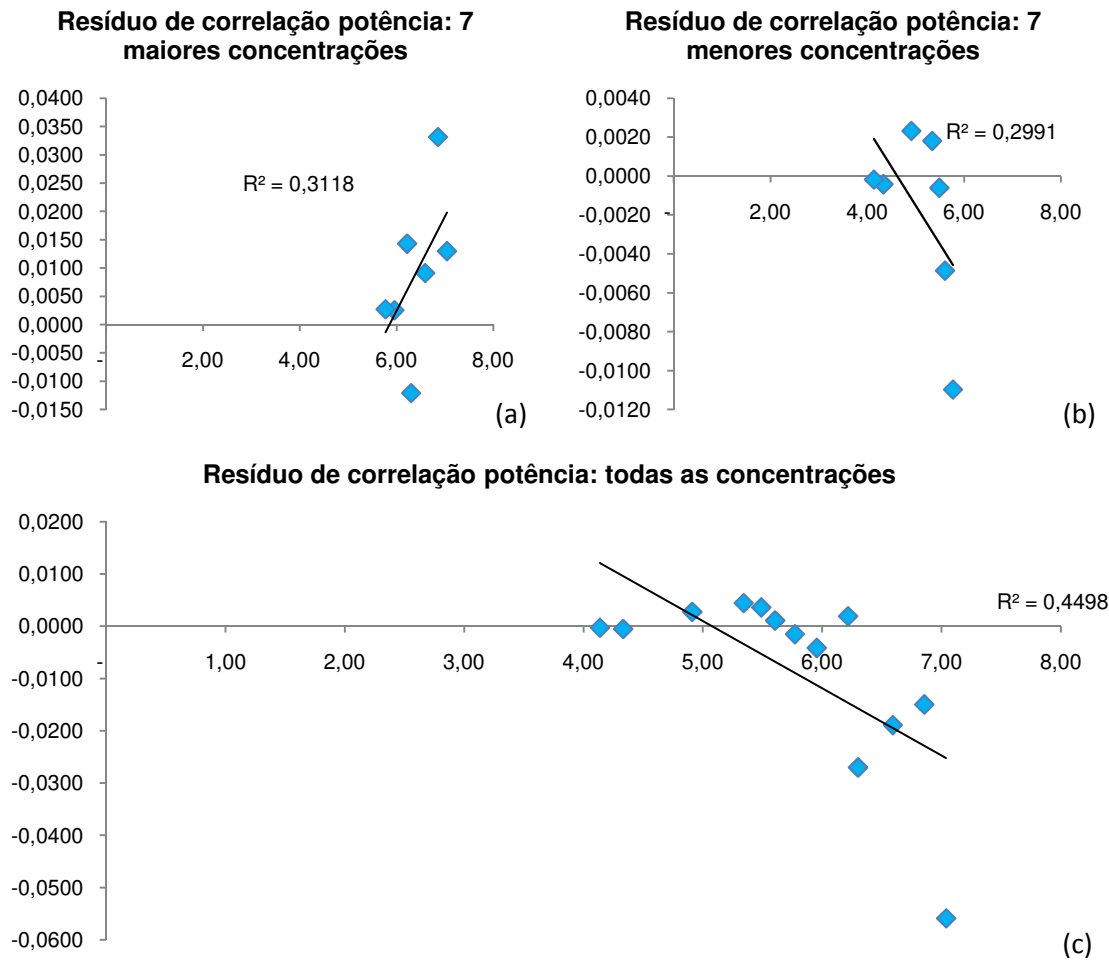


Figura 5: Perfil de resíduos entre as equações potência de 7 maiores (a), 7 menores (b) e todas (c) as concentrações celulares estudadas.

Os valores de absorvância esperados usados nesses gráficos estão no apêndice, tabela A3 e A4, para as correlações lineares e de potência, respectivamente.

4.5 Faixa de trabalho

Como o perfil de resíduos das correlações lineares separadas entre as 7 maiores e 7 menores concentrações não apresentam tendência prejudicial ao

método (fig3 a e b), suas equações correspondentes (fig1 a e b) foram escolhidas como capazes de prever o número de células.mL⁻¹ de forma satisfatória. Essas duas equações compõem a faixa de trabalho do novo método. Ambas as retas se cruzam no plano cartesiano, e este ponto foi determinado (colocando uma equação como resultado da outra) como sendo igual a 1.230.000 células, refletido na absorbância de 0,0849. Qualquer amostra analisada que resultar nessa absorbância ou menor será tratada como pertencente a equação de baixas concentrações, e amostras com absorbâncias maiores do que essa serão tratadas como pertencentes a equação de altas concentrações. Ao isolar a variável X em cada equação obtiveram-se as seguintes equações:

$$x = \left(\frac{y}{4 \cdot 10^{-8}}\right) - 0,0357 \quad (1)$$

$$x = \left(\frac{y}{7 \cdot 10^{-8}}\right) + 0,0012 \quad (2)$$

Elas resultam, respectivamente, no número de células esperadas para altas (1) e baixas (2) concentrações celulares quando se insere o valor Y de absorbância. O número de células esperado pelas equações está na tabela 3.

Tabela 3: Número esperado de células para cada amostra utilizando as equações de maiores e menores concentrações.

7 maiores concentrações	número de células esperado	7 menores concentrações	número de células esperado
1	10532500	7	612857
2	6868333	8	411429
3	4266667	9	287143
4	2560000	10	188571
5	1437500	11	66667
6	655833	12	45714
7	150000	13	33810

4.6 Sensibilidade do método espectrofotométrico

O LD, determinado a partir da absorbância da matriz utilizada nas leituras, a 436nm, ficou estabelecido para a absorbância de 0,004, que equivale a 22.857 células.mL⁻¹. Qualquer amostra de cianobactérias, da linhagem utilizada e cultivada no meio ASM-1, que apontar uma absorbância maior do que essa terá 99% de chance de ter uma densidade celular maior do que zero. Os resultados das leituras de absorbância do branco estão tabelados no apêndice, na tabela A5.

O valor de absorbância estipulado para o LQ foi de 0,0012, que equivale a cerca de 33.810.mL⁻¹. Amostras com absorbâncias menores do que essas possuem uma densidade celular baixa demais para serem quantificadas de forma satisfatória. Os resultados das leituras de absorbância do LQ, nas duas concentrações em que ele foi testado, estão tabelados no apêndice, nas tabela A5, junto dos resultados das leituras de absorbância do branco utilizados na determinação do LD.

4.7 Validação estatística do método espectrofotométrico

Aplicou-se o teste F, e ele mostrou que as variâncias são similares para ambos os métodos. Este resultado demonstra que o método espectrofotométrico

apresenta desempenho satisfatório para a determinação de cianobactérias, quando comparado com o método tradicional de contagem pela câmara de Sedgewick-rafter. Pode-se afirmar que a exatidão e a precisão do método espectrofotométrico apresentam confiabilidade analítica. Antes de fazer-se o cálculo das variâncias, todos os valores de densidade celular foram revertidos a logaritmo de base 10, pois isso facilita a comparação entre altas e baixas densidades. Obtiveram-se os valores $F_{\text{calc}}=1,90 < F_{0,05;6;6}=5,82$ para os resultados das equações de maiores concentrações e $F_{\text{calc}}=1,68 < F_{0,05;6;6}=5,82$ para os resultados das equações de menores concentrações.

Os conjuntos de valores utilizados para os cálculos do teste F estão no apêndice, na tabela A6.

5 Discussão

O pico de absorvância escolhido foi o mais apropriado possível. Os outros 2 picos de 672 e 623nm não teriam uma resolução tão alta como o pico de 436nm, que consegue trabalhar com uma escala mais abrangente de absorvâncias. Os picos de 286, 204 e 206nm refletem as ligações orgânicas das moléculas das algas, e por não estarem no espectro da luz visível, não poderiam ser utilizados.

As contagens em câmara de Sedgwick-Rafter, mesmo sendo um método muito abrangente e amplamente utilizado, estão sujeitas a vários erros além dos erros tabelados (CETESB, 2005). Uma das fontes de erros mais severas é a diluição das amostras (visível na tabela A1), que se faz necessária quando as densidades celulares são muito altas. A amostra diluída já não representa com exatidão aquela lida no espectrofotômetro, e também adiciona erros de calibração das vidrarias usadas e da acuidade visual nas as medidas de volume. O próprio método de contagem, por estar trabalhando com médias, já possui um erro maior do que 6% ao se analisar as réplicas (ver tabela A1), e em alguns momentos resultados incoerentes são alcançados. As amostras 6a, 5b e 9c, por exemplo, apresentaram uma densidade superior a amostras que são inquestionavelmente mais densas (aquelas com numeração menor do que as elas mesmas), devido à forma que as diluições seriadas foram realizadas. Essas 3 réplicas foram desconsideradas para a determinação da média de todas as réplicas. As leituras de absorvância refletem diretamente a densidade celular, e em momento algum apresentaram esse tipo de incoerência. A câmara de Sedgwick-Rafter de material plástico utilizada também estava levemente danificada, devido a grande quantidade de uso.

A principal diferença entre as correlações de potência e lineares está na abrangência da faixa de trabalho. Apenas as correlações de potência conseguem prever um resultado, em número de células, para toda a faixa de trabalho quando se consideram todos os pontos em uma só equação. Porém, como o perfil de resíduos nos mostra, a correlação potência é tendenciosa ao determinar o número de células. Quando todos os pontos em uma reta são avaliados por correlação linear, nas amostras de absorvância muito pequenas (como a partir da amostra 10 – ver tabela 1), a equação retorna uma densidade celular negativa, o que é completamente incoerente. Assim, a melhor alternativa foi dividir a faixa de trabalho em dois grupos de mesmo tamanho, compartilhando um dos pontos analisados, pois ao menos 7 pontos são necessários para formação de uma equação de regressão que valida um método (INMETRO, 2007).

A equação de regressão $x = \left(\frac{y}{4 \cdot 10^{-8}}\right) - 0,0357$, sendo Y a absorvância e X o número de células, deve ser utilizada para amostras com absorvância maior ou igual a 0,0850.

A equação de regressão $x = \left(\frac{y}{7 \cdot 10^{-8}}\right) + 0,0012$, sendo Y a absorvância e X o número de células devem ser utilizadas para amostras com absorvância igual ou menor a 0,0849.

O valor de absorvância 0,0849 é o ponto onde as retas se tocam no plano cartesiano, uma vez que elas possuem inclinações diferentes (refletida no diferente R^2). Note que as amostras 6 e 7, apesar de fazerem parte da calibração da curva de maiores densidades, deveriam ambas ser quantificadas pela curva de menores

densidades. Isso possivelmente ocorre pelo fato de que as amostras 6 e 7 ainda pertencem a categoria de baixas densidades, mas devido a limitação do número de amostras estudadas precisavam fazer parte da categoria de altas densidades.

Mesmo estando o LD e LQ determinados, dificilmente haverá amostras que farão uso destes limites. Considerando-se que o método está projetado para condições laboratoriais, estas freqüentemente mantêm os cultivos de algas em altas densidades (TAKENAKA, 2007). Mesmo assim, caso haja necessidade de quantificar amostras que estejam abaixo desses limites, é válido centrifugar as amostras a 2500 rpm por 20 minutos, para então descartar uma porção do sobrenadante (CETESB, 2005). Caso as concentrações celulares estejam acima daquelas encontradas empiricamente neste trabalho (limite superior de 10 milhões de células.mL⁻¹), basta diluir as amostras com meio de cultura até que estas fiquem com uma absorbância menor ou igual a 0,4570 (absorbância da amostra 1, a mais densa amostra estudada)

O resultado do teste F demonstrou que as variâncias dos dois métodos não diferem. Com isso podemos afirmar que a variabilidade dos resultados de um dos métodos, em torno de uma média, é similar, em números absolutos, a variação dos resultados do outro método, em torno de uma média. Como os resultados finais de quantificação celular não mudam de forma estatisticamente significativa caso a amostra seja analisada pelo método espectrofotométrico ou de contagem microscópica, o novo método pode ser utilizado sem risco de comprometimento dos resultados.

Um ponto interessante do novo método, além da grande diferença de agilidade na análise de amostras, é que ele não utiliza preservantes, como o Lugol. O Lugol é tóxico para humanos e para o ambiente, não pode ser reutilizado e precisa de descarte especial. As contagens em microscopia podem precisar de reagentes químicos, para que as células não deteriorem nem multipliquem com o tempo. Um número grande de amostras pode levar várias semanas para ser contado, mas a necessidade de preservação das amostras para análises posteriores desaparece.

6 Conclusão

Apesar de algumas diferenças, em comparação com as contagens em câmara de Sedgwick-Rafter, o método desenvolvido apresentou-se satisfatoriamente confiável e estatisticamente validado.

Repetições desse experimento, aumento do número de réplicas ou do número de pontos estudados invariavelmente retornarão diferentes equações de regressão, pois tanto a leitura de absorvância como o resultando das contagens apresentam uma variação em torno do valor verdadeiro. O resultado de repetições dos experimentos, porém, deve flutuar em torno de uma “equação verdadeira” que reflete a natureza física da correlação absorvância a 436nm com o número de células. Cabe aos investigadores julgar quando há exatidão no método para que ele seja aplicado de maneira satisfatória.

7 Sugestões para continuidade do trabalho

Futuros estudos sobre o assunto podem abordar densidades celulares maiores, para preencher toda a curva de crescimento descrita para essa linhagem (TAKENAKA, 2007). Poderiam ser feitas comparações múltiplas entre absorvância e outras formas de quantificação além das contagens em câmara de Sedgwick-Rafter, como contagens em câmaras de Utermöhl, quantificação por PRC em tempo real e quantificação por PCR competitivo. Também seria interessante trabalhar com outras linhagens de interesse e mesmo outras espécies de cianobactérias. Outra abordagem interessante seria verificar se o método é eficiente caso colônias de *Microcystis aeruginosa* forem dissociadas com reagentes químicos (CETESB, 2005), pois isso poderia aumentar a aplicabilidade do método.

8 Bibliografia

APHA (American Public Health Association). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21th ed. New York: APHA:AWWA:WEF, 2001.

BARROS, S.G.; OLIVEIRA, M.C.B. Desenvolvimento de metodologia molecular para quantificação de cianobactérias hepatotóxicas. In: Congresso Brasileiro de Limnologia, 12., 2009, Gramado. **Anais eletronicos...** Gramado: Sociedade Brasileira de Limnologia, 2009. 1 CD.

BETTINA, C.; HITZFELD, S. J.; HÖGER, D.R.D. Cyanobacterial Toxins: Removal during Drinking Water Treatment, and Human Risk Assessment. **Environtal Health Perspectives** v. 108 n. 1, p. 113-122, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no 518, de 03/2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004.

CALIJURI, M.C. **Cianobactérias e cianotoxinas em águas continentais**. São Carlos: RiMa, 2006, 118 p.

CARMICHAEL, W. W.; AZEVEDO, S.M.F.O; AN, J.S.. MOLICA, R.J.R.; ELISE M.J.; E.M.; LAU, S.; RINEHART, K.L.; SHAW, G.R.; EAGLESHAM G.K. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environtal Health Perspectives** v. 109, n.7, p.663–668, 2001.

CARPENTER, S.R.; CARACO, N.F.; CORRELL, D.L.; HOWARTH, R.W.; SHARPLEY, A.N.; SMITH, V.H. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. **Ecological Applications**, v.8, p.559-568, 1998

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL) (São Paulo). **Norma Técnica L5.303**: Fitoplâncton de água doce. Métodos qualitativo e Quantitativo. São Paulo, 2005.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic Cyanobacteria in Water**: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E & FN Spon (OMS - Organização Mundial da Saúde), 1999, 400 p.

ELLIOTT, M., JONGE, V.N. The management of nutrients and potential eutrophication in estuaries and other restricted water bodies. **Hydrobiologia** v. 475, n. 476, p. 513–524, 2002.

FALCONER, I.R. Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins In: HUDNELL, H.K. (ed) **Cyanobacterial Harmful Algal**

Blooms: State of the Science and Research Needs. New York: Springer , 2008. Cap. 27, pag. 607-612.

FERREIRA, A.H.F. **Peptides In Cyanobacteria Under Different Environmental Conditions**. 2006, 162 f. Tese (doutorado em ciências naturais) – Faculdade de Ciencia de Processos, Universidade Técnica de Berlin, Berlin.

HOTLOS, H. Quantity and availability of freshwater resources: The world - Europe-Poland. **Environment Protection Engineering**,. v. 34, n. 2, p. 67-77, 2008.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008** revisão 02, 35 p. 2007

JOCHIMSEN, E.M., CARMICHAEL, W.W., JISI A.; CARDO, D.M., COOKSON, S.T.; HOLMES,C.E.M.; ANTUNES, M.B.; MELO FILHO, D.A.; LYRA, T.M.; BARRETO, V.S.T.; AZEVEDO, S.M.F.O.; JARVIS, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brasil. **New England Journal of Medicine**, 338, n. 13: 873-878, 1998

KURODA, E.K.; MINILLO, A.; ROCHA, O.; RODRIGUES F.E.; BERNARDO, L. Avaliação da toxicidade aguda de uma cepa de *Microcystis* spp. por meio de testes com camundongos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.12, n.1, pp. 24-31, 2007.

LAHTI, K.; RAPALA, J.; KIVIMÄKI A.L.; KUKKONEN, J.; NIEMELÄ, M.; SIVONEN, K. Occurrence of microcystins in raw water sources and treated drinking water of Finnish waterworks. **Water Science and Technology**, v 43 N. 12 p. 225–228, 2001.

LAU, S.S.S., LANE, S.N. Biological and chemical factors influencing shallow lake eutrophication: a long-term study. **The Science of the Total Environment**, v. 288, n. 3 p.167-181, 2002 .

OKI, T. KANAE, S. Global Hydrological Cycles and World Water Resources. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1068 – 1072, 2006.

PILOTTO, L.S. Epidemiology of cyanobacteria and their toxins In: HUDNELL, H.K. (ed) **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. New York: Springer , 2008. Cap. 29, pag. 639-649.

PIMENTEL, J.S.M.; GIANI, A. Avaliação da toxicidade de cianobactérias, através de métodos moleculares, no reservatório de Furnas, MG, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Limnologia, 12., 2009, Gramado. **Anais eletronicos...** Gramado: Sociedade Brasileira de Limnologia, 2009. 1 CD.

RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; ALBANO, F.M. . **Validação e Garantia da Qualidade de Ensaios Laboratoriais**. 1. ed. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, 2009. 136 p.

RODRIGUES, L.H.R. **Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria.** 2002, 96 f. Tese - (Mestrado em Ecologia), Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SAKAI, H.; OGUMA, K.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S. Effects of low- or medium-pressure ultraviolet lamp irradiation on *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena variabilis*. **Water Research**. v. 41, n.1 p. 11–18, 2007

SANTOS, A.P.M.E.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Hepatotoxicity associated with microcystin. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 2, p. 417-430, 2008.

TSUJI, K.; WATANULI, T.; KONDO, F.; WATANABE M.F.; SUZUKI, S.; NAKAZAWA, H.; SUZUKI, M.; UCHIDA, H.; HARADA, K. Stability of microcystins from cyanobacteria – II. Effects of UV light on decomposition and isomerization.. **Toxicon**, v. 33, n. 12, p. 1619-1631, 1995.

VALER, R.M. GLOCK, L.. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método da espectrofotométrico. **Acta Limnológica Brasiliensis**, v. 11, n.2, p. 149-156. 1998.

WENDELL J.; DAN, C. Evaluating Treatment Processes for Removing Cyanobacterial Toxins from Drinking Water Supplies.. Water Treatment Group, Alberta Research Council, **Alberta Environment**, Governo de Alberta, Canadá, 2004

WESTRICK, J.A. Cyanobacterial toxin removal in drinking water treatment processes and recreational waters. In: HUDNELL, H.K. (ed) **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. New York: Springer , 2008. Cap. 13, pag. 275-290.

9 Apêndice: tabelas com dados brutos

Tabela A1: Contagem do número de células para cada réplica (a, b e c).

amostra	n cel contadas	n campos contados	diluição	erro	n cel observado
1a	1.046	13	100	6,18	8.577.200
2a	1.032	7	50	6,23	7.857.943
3a	1.089	19	50	6,06	3.054.932
4a	1.109	6	10	6,01	1.970.323
5a	1.027	7	10	6,24	1.563.974
6a	508	13	50	8,87	2.082.800
7a	1.055	8	4	6,16	562.315
8a	1.017	5	2	6,27	433.649
9a	1.118	8	2	5,98	297.947
10a	1.037	5	1	6,21	221.088
11a	1.039	12	1	6,20	92.298
12a	410	20	1	9,88	21.853
13a	217	20	1	13,58	11.566

amostra	n cel contadas	n campos contados	diluição	erro	n cel observado
1b	1.116	9	100	5,99	13.218.400
2b	1.051	15	100	6,17	7.469.107
3b	1.347	3	10	5,45	4.786.340
4b	1.105	6	10	6,02	1.963.217
5b	1.202	6	10	5,77	2.135.553
6b	1.036	10	10	6,21	1.104.376
7b	1.160	2	1	5,87	618.280
8b	1.290	3	1	5,57	458.380
9b	1.195	4	1	5,79	318.468
10b	1.102	5	1	6,02	234.946
11b	1.027	13	1	6,24	84.214
12b	401	20	1	9,99	21.373
13b	219	15	1	13,51	15.564

amostra	n cel contadas	n campos contados	diluição	erro	n cel observado
1c	1.025	10	100	6,25	10.926.500
2c	1.036	9	50	6,21	6.135.422
3c	1.011	14	50	6,29	3.849.021
4c	1.154	6	10	5,89	2.050.273
5c	1.133	7	10	5,94	1.725.397
6c	1.045	16	10	6,19	696.231
7c	1.104	8	4	6,02	588.432
8c	1.040	7	2	6,20	316.754
9c	1.152	5	2	5,89	491.213
10c	1.141	6	1	5,92	202.718
11c	1.021	16	1	6,26	68.024
12c	401	20	1	9,99	21.373
13c	253	19	1	12,57	14.195

Tabela A2: Absorbâncias para cada réplica e média da absorbância. Cada uma das réplicas já é a média dos 5 registros de absorbância que são realizadas pelo espectrofotômetro a cada leitura.

amostra	abs 1	abs 2	abs 3	med abs
1	0,4571	0,4579	0,4560	0,4570
2	0,3087	0,3102	0,3124	0,3104
3	0,2069	0,2059	0,2063	0,2064
4	0,1377	0,1390	0,1376	0,1381
5	0,0926	0,0919	0,0951	0,0932
6	0,0614	0,0628	0,0616	0,0619
7	0,0409	0,0419	0,0423	0,0417
8	0,0269	0,0280	0,0279	0,0276
9	0,0182	0,0199	0,0186	0,0189
10	0,0115	0,0125	0,0120	0,0120
11	0,0035	0,0030	0,0039	0,0035

Tabela A3: Resíduos calculados para cada equação de correlação linear

7 maiores con	abs esperada	resíduo	7 menores con	abs esperada	resíduo
1	0,4720	0,0150	7	0,0401	-0,0016
2	0,3219	0,0114	8	0,0270	-0,0006
3	0,1916	-0,0148	9	0,0204	0,0015
4	0,1155	-0,0226	10	0,0142	0,0022
5	0,1015	0,0083	11	0,0045	0,0010
6	0,0717	0,0098	12	0,0003	-0,0017
7	0,0593	0,0176	13	-0,0002	-0,0014

todas as concentrações	abs esperada	resíduo
1	0,4511	-0,0059
2	0,3010	-0,0095
3	0,1707	-0,0357
4	0,0946	-0,0435
5	0,0806	-0,0126
6	0,0508	-0,0111
7	0,0384	-0,0033
8	0,0309	0,0033
9	0,0271	0,0082
10	0,0236	0,0116
11	0,0181	0,0146
12	0,0157	0,0137
13	0,0154	0,0142

Tabela A4: Resíduos calculados para cada equação de correlação de potência

7 maiores con	abs esperada	resíduo	7 menores con	abs esperada	resíduo
1	0,4700	0,0130	7	0,0307	-0,0110
2	0,3436	0,0331	8	0,0227	-0,0049
3	0,2155	0,0091	9	0,0183	-0,0006
4	0,1260	-0,0121	10	0,0138	0,0018
5	0,1075	0,0143	11	0,0058	0,0023
6	0,0645	0,0026	12	0,0016	-0,0004
7	0,0444	0,0027	13	0,0010	-0,0002

todas as concentrações	abs esperada	resíduo
1	0,4011	-0,0559
2	0,2955	-0,0150
3	0,1874	-0,0189
4	0,1111	-0,0270
5	0,0951	0,0019
6	0,0578	-0,0042
7	0,0402	-0,0015
8	0,0287	0,0011
9	0,0225	0,0036
10	0,0164	0,0044
11	0,0062	0,0027
12	0,0014	-0,0006
13	0,0009	-0,0003

Tabela A5: Absorbâncias obtidas para determinação do limite de detecção e limite de quantificação.

Replicata	Abs: LD	Abs: LQ amostra 12	Abs: LQ amostra 13
1	-0,0002	0,0012	0,0010
2	0,0001	0,0015	0,0009
3	-0,0002	0,0019	0,0008
4	0,0000	0,0023	0,0010
5	-0,0002	0,0027	0,0017
6	-0,0003	0,0021	0,0017
7	0,0001	0,0021	0,0011
media	-0,0001	0,0020	0,0012
desvpad	0,0002	0,0005	0,0004

Tabela A6: Densidades celulares, transformadas em logaritmo, que foram utilizadas para o cálculo do teste F

amostra	log n cel esp maiores concentrações	log n cel obs	amostra	log n cel esp menores concentrações	log n cel obs
1	7,02	7,04	7	5,79	5,77
2	6,84	6,85	8	5,61	5,61
3	6,63	6,59	9	5,46	5,49
4	6,41	6,30	10	5,28	5,34
5	6,16	6,22	11	4,82	4,91
6	5,82	5,95	12	4,66	4,33
7	5,18	5,77	13	4,53	4,14
Variância	0,4971	0,2145	Variância	0,2438	0,4099