

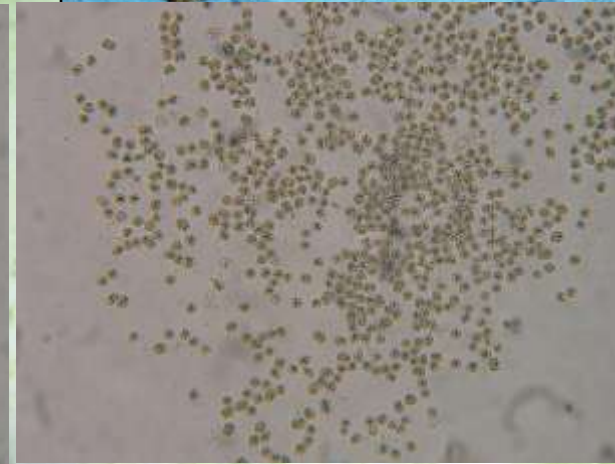
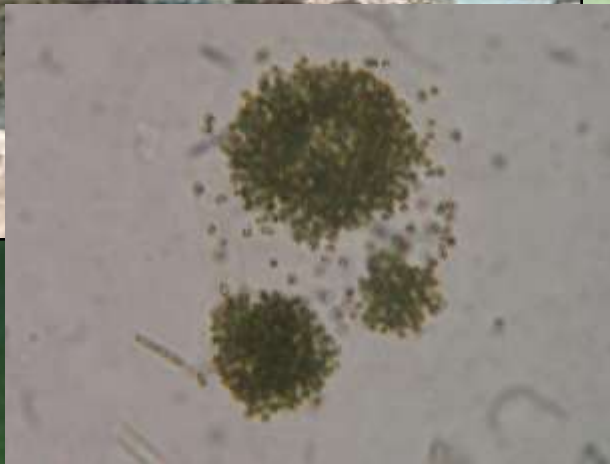


Avanços e perspectivas no  
diagnóstico de cianobactérias  
desenvolvido pela FUNASA  
(SUEST-PE/DESAM/COCCAG)

# O que são cianobactérias?

Algas azuis, cianofíceas ou Cyanophyta

Origem:



(a atual);

Matéria  
orgânica  
abiótica

Fotossíntese  
a partir do  
 $H_2S$  – libera  
S

1° ser vivo  
heterótrofo



**Autótrofo**  
(quimiossíntese)



**Autótrofo**  
(fotossíntese - anaeróbica)



**Autótrofo**  
(fotossíntese - aeróbica)

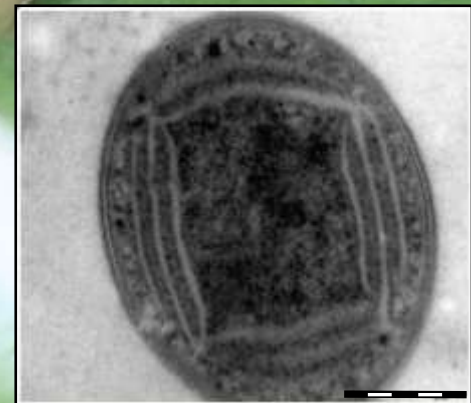
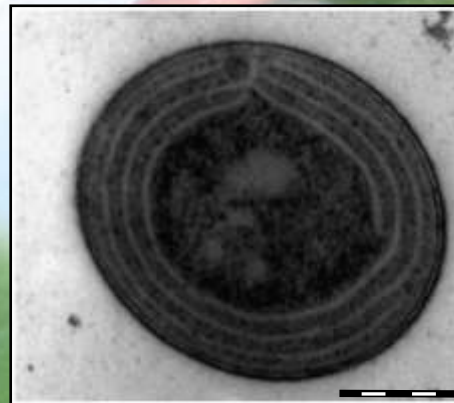
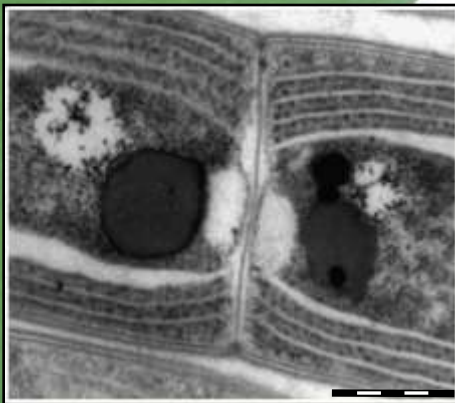
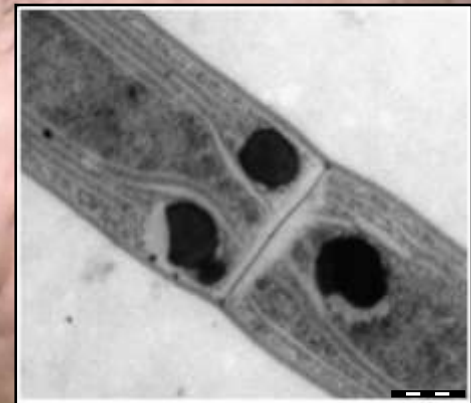
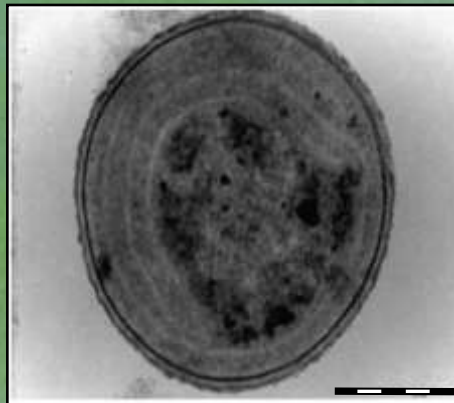
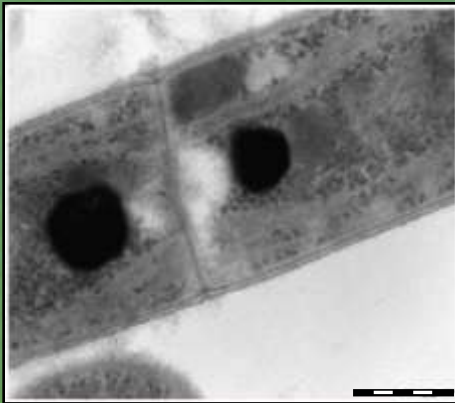
Conversão  
de  $CO_2$  em  
matéria  
orgânica

Fotossíntese  
a partir do  
 $H_2O$  – libera  
O



# Características:

Organização celular (seres procarióticos/  
semelhança com bactérias);





# Características:

Capacidade  
enzimática

Pigmentos

=

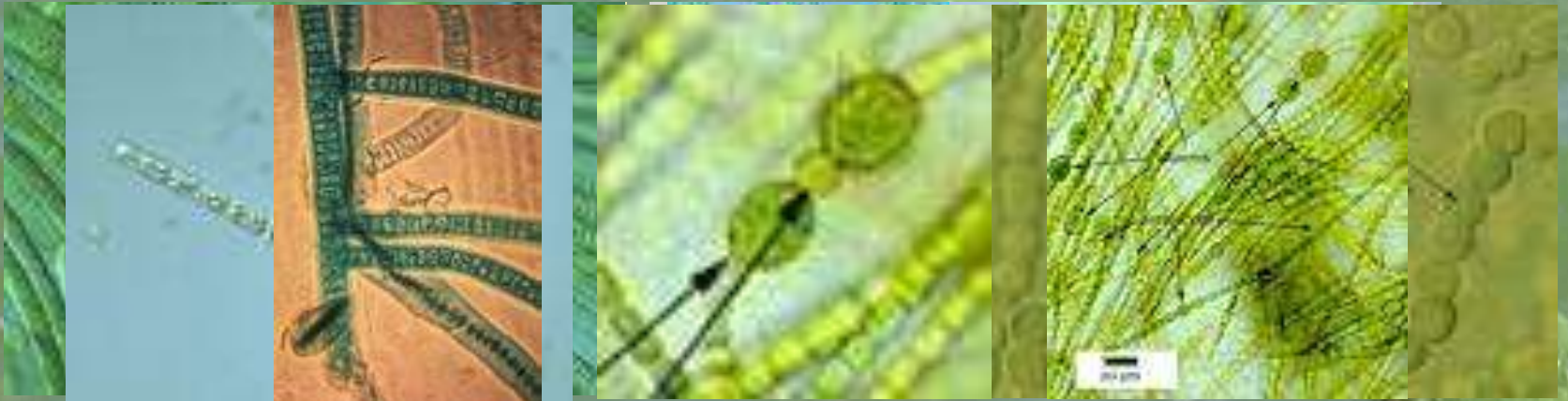
Fotossíntese

- Estruturalmente e fisiologicamente = bactérias
- Funcionalmente = plantas dos sist. aquáticos



- **Unicelulares (fixos, livres ou aderidos em colônias) ou filamentosos.**

Ordens	Características
Chroococcales	Algas unicelulares que vivem aderidas, formando colônias palmeloídes
Oscillatoriales	Filamentosas com falsas ramificações/ hormogônios
Nostocales	Filamentosas/ presença de acinetos e heterócitos
Stigonematales	Talo multiseriado/ hormogônios/ presença de acinetos



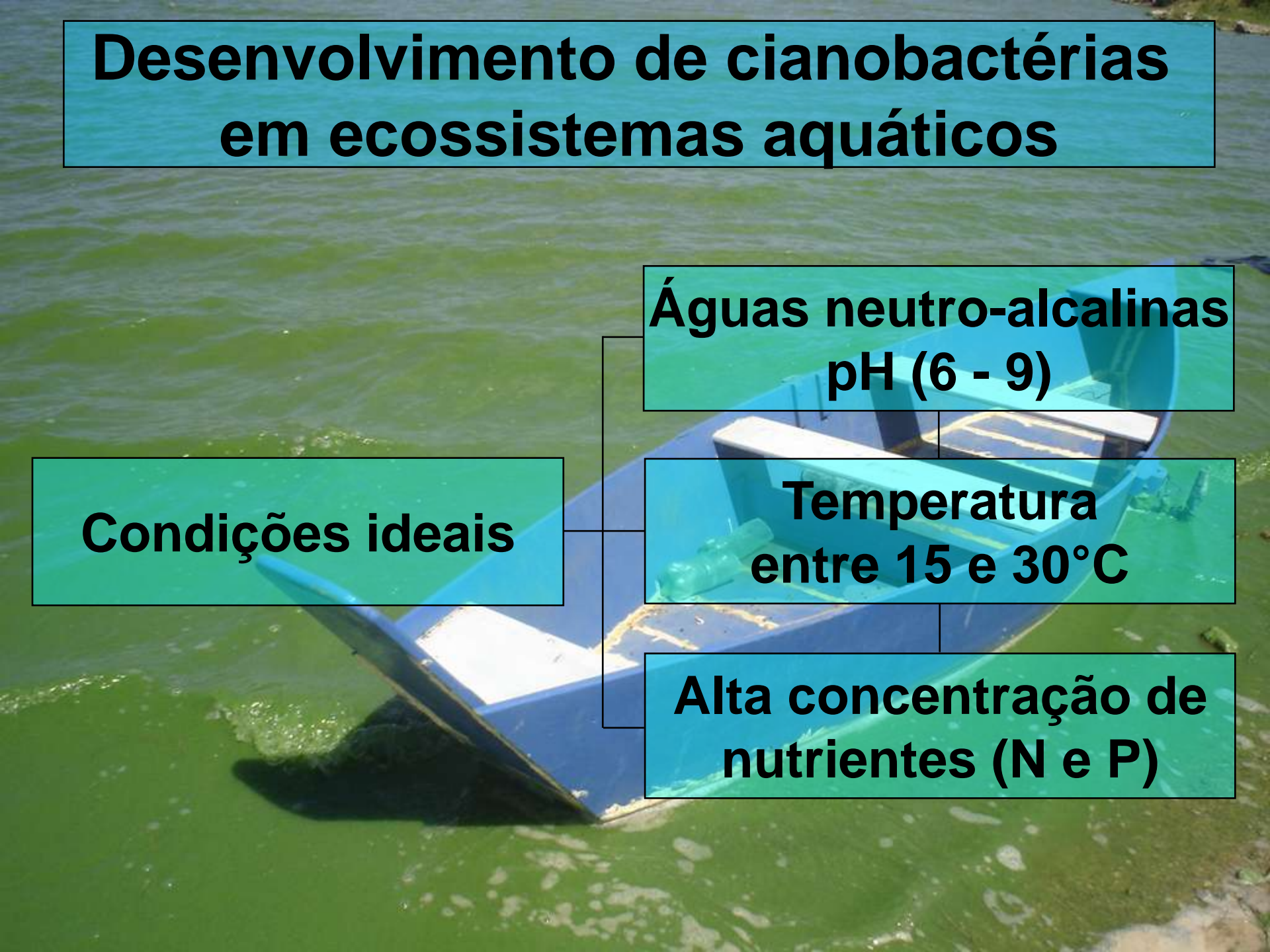
# **Desenvolvimento de cianobactérias em ecossistemas aquáticos**

**Águas neutro-alcálinas  
pH (6 - 9)**

**Condições ideais**

**Temperatura  
entre 15 e 30°C**

**Alta concentração de  
nutrientes (N e P)**







**Condições ambientais**

**+**



**Eutrofização**

**||**



**Quebra do equilíbrio na comunidade**

**Decréscimo na diversidade de espécies**

**Crescimento acelerado de espécies oportunistas**



- As florações caracterizam-se pelo crescimento exagerado de populações de poucas espécies em um curto espaço de tempo.

## Florações

↓ **oxigênio**

↓ **qualidades  
cênicas**

↑ **custo do  
tratamento**

↑ **riscos  
ambientais**

# Florações de cianobactérias e produção de toxinas

Muitos gêneros e espécies de cianobactérias que formam florações são potencialmente tóxicos:

- Aproximadamente 40 espécies

**Cianotoxinas: produto metabólito secundário:**

- Função protetora contra herbivoria;
- Liberadas a partir de lise celular.



- Atualmente são conhecidos 3 grupos de agentes tóxicos liberados pelas cianobactérias, classificados de acordo com o seu mecanismo de ação:

- ✓ Neurotoxinas;

- ✓ Hepatotoxinas;

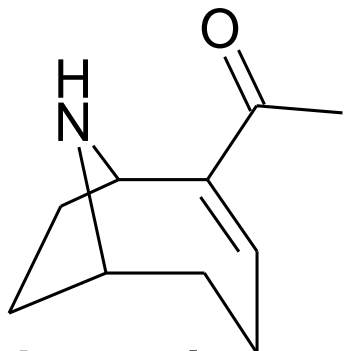
- ✓ Dermatotoxinas.



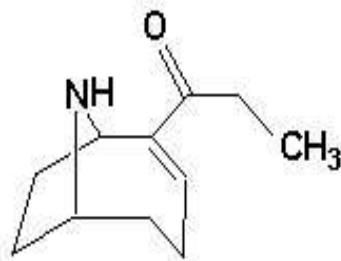
- classificação (estrutura química): peptídeos cíclicos, alcalóides e lipopolissacarídeos.

## Neurotoxinas

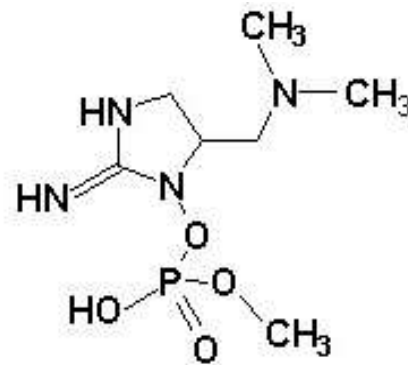
- Alcalóides ou organofosfatados neurotóxicos:



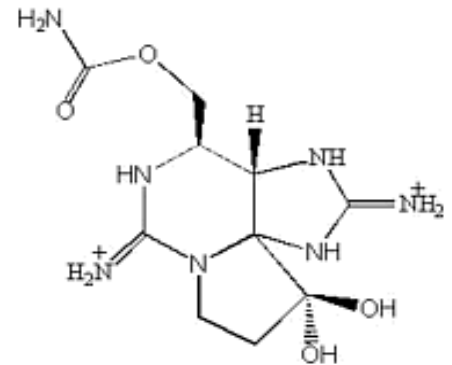
Anatoxina-a



Homoanatoxina-a



Anatoxina-a(s)

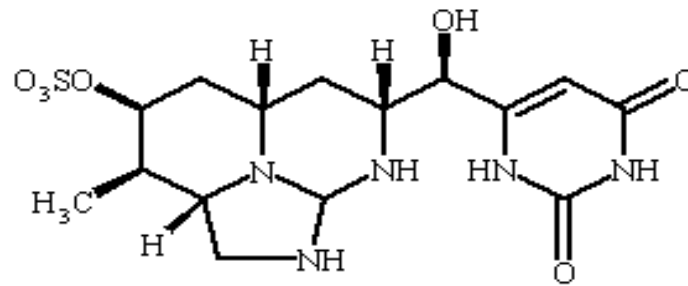
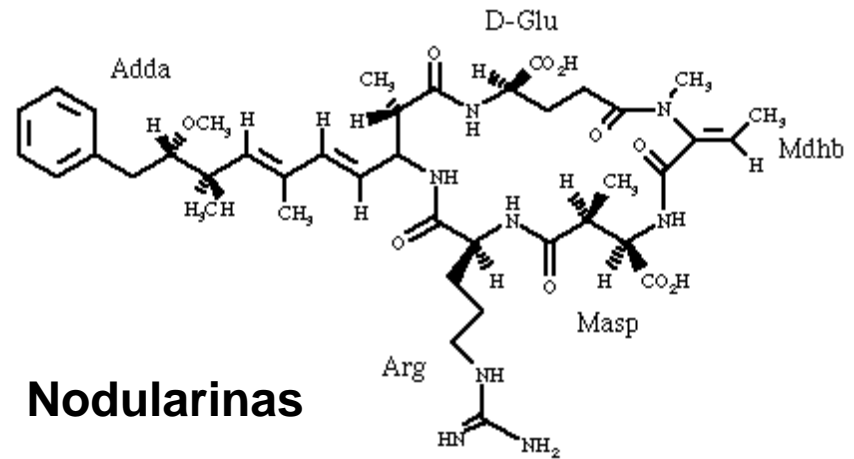
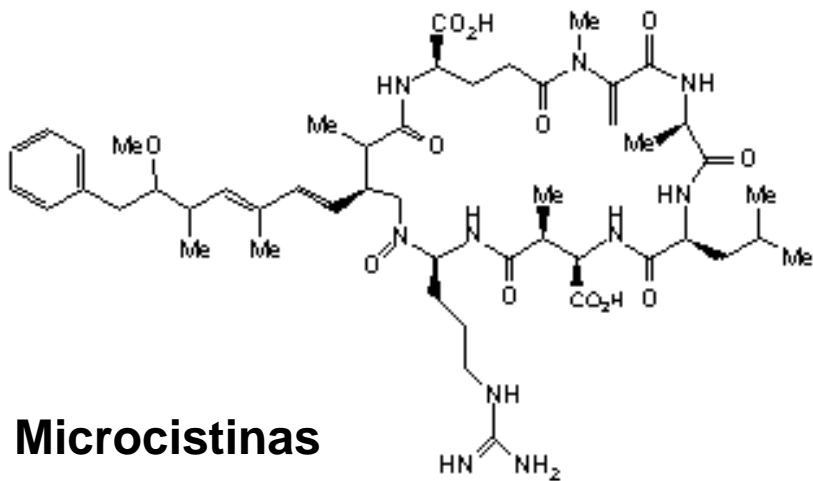


Saxitoxina



# Hepatotoxinas

- Peptídeos cíclicos ou alcalóides hepatotóxicos: microcistinas, nodularinas e cilindrospermopsina.



**Cilindrospermopsina**

<b>Toxina</b>	<b>Como e onde age</b>	<b>Gênero</b>
Microcistina	Inibidora de enzimas fosfatases 1 e 2A – Fígado (hepatócitos)	<i>Microcystis, Anabaena, Planktothrix, Nostoc, Hapalosiphon e Anabaenopsis</i>
Nodularina	Inibidora de enzimas fosfatases 1 e 2A – Fígado (hepatócitos)	<i>Nodularia</i>
Cilindrospermopsina	Inibidora de síntese proteica – Fígado	<i>Cylindrospermopsis, Umezakia, Aphanizomenon e Raphidiopsis</i>
Saxitoxina	Liga-se aos canais de sódio – Membrana do axônio	<i>Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya e Cylindrospermopsis</i>
Anatoxina-a	Liga-se ao receptor da acetilcolina – Sinapse nervosa	<i>Anabaena, Planktothrix, Aphanizomenon e Raphidiopsis</i>
Anatoxina-a(s)	Inibidora da acetilcolinesterase – Sinapse nervosa	<i>Anabaena</i>

Fonte: Bittencourt-Oliveira e Molica (2003).



# Histórico de contaminação por cianotoxinas

- 1º caso, Austrália, 1878 ⇒ morte de ovelhas, cavalos e cães;
- África do Sul, 1943 ⇒ ovelhas, bovinos e outros animais ⇔ *Microcystis aeruginosa*;
- EUA, 1952 ⇒ morte de 7000 animais ⇔ *Anabaena flos-aquae*.

O Brasil possui um recente histórico de contaminação por cianotoxinas, no entanto, alguns casos não foram comprovados

“Teixeira et al. (1993) descreve forte evidência entre a ocorrência de florações de cianobactérias, no reservatório de Itaparica (Bahia) e a morte de 86 pessoas, entre 200 intoxicadas pelo consumo de água do reservatório, entre março e abril de 1988”.

03/15/2008





EDITORIA VEJA - EDIÇÃO 1.432  
ANO 29 - Nº 22 - DE 3.88  
8 DE JUNHO DE 1995

# veja

- “Síndrome de Caruaru” ⇒ 76 mortes em clínica de hemodiálise;
- 52 amostras de fígado de 39 pacientes foram positivas para microcistina.

**52 mortos em Caruaru**

**ANATOMIA  
DE UMA  
TRAGÉDIA**



**Table 1.** Toxic species of Cyanobacteria and occurrence in tropical and subtropical Brazilian regions.

Cyanobacteria	Tropical region	Subtropical region	Toxins	Methods	References
<b>Chroococcales</b>					
<i>Aphanocapsa cumulus</i>	X		Microcystin	ELISA, HPLC	DOMINGOS et al. 1999
<i>Aphanothece bachmannii</i>		X	Unknown	Bioassay, MALDI-TOF	<b>This study</b>
<i>Microcystis aeruginosa</i>	X	X	Microcystins	Bioassay, ELISA, HPLC-DAD, HPLC-MS	BOBEDA 1993; ZAGATTO et al. 1998; YUNES et al. 1996; MAGALHÃES & AZEVEDO 1998; HIROOKA et al. 1999; MATHIENSEN et al. 1999, 2000; POGFIRIO et al. 1999; JARDIM et al. 2000, 2004a; MINILLO et al. 2000; JARDIM & VIANA 2003; AZEVEDO et al. 2004; SOTERO-SANTOS et al. 2005; ANJOS et al. 2006
<i>M. batrys</i>	X	X	Microcystin	Bioassay, HPLC, LC-MS	ANJOS et al. 2006; COPASA (unpublished)
<i>M. novacekii</i>	X	X	Microcystin	Bioassay, HPLC, LC-MS	JARDIM et al. 2000, 2004a; COPASA (unpublished); JARDIM & VIANA 2003; ANJOS et al. 2006
<i>M. panniformis</i>	X	X	Microcystin	Bioassay, MALDI-TOF	JARDIM et al. 2000, 2004a; COPASA (unpublished); ANJOS et al. 2006; CARVALHO et al. 2006; CORSAN (unpublished)
<i>M. protocystis</i>	X	X	Microcystin	Bioassay, HPLC, LC-MS	JARDIM et al. 2003; ANJOS et al. 2006
<i>M. viridis</i>	X	X	Microcystin	Bioassay, HPLC	COPASA (unpublished); VIEIRA et al. 2005; <b>This study</b>
<i>M. wiesenbergii</i>	X	X	Microcystin	Bioassay, MALDI-TOF	JARDIM et al. 2000; <b>This study</b>
<i>Radiocystis fernandoi</i>	X		Microcystin	Bioassay, HPLC, MALDI-TOF	JARDIM et al. 2000, 2001b, 2004a; COPASA (unpublished); JARDIM & VIANA 2003; VIEIRA et al. 2003, 2005; LOMBARDO et al. 2006; <b>This study</b>

Brasil: 32 espécies



<i>Synechocystis aquatilis</i>	X		Microcystin	Immunoassay	NASCIMENTO & AZEVEDO 1999; MAGALHÃES et al. 2003
<i>Synechococcus nidulans</i>		X	Unknown	Bioassay, MALDI TOF	<b>This study</b>
<b>Oscillatoriales</b>					
<i>Geitlerinema amphibium</i>		X	Unknown	Bioassay	ZAGATTO et al. 1998
<i>G. unigranulatum</i>		X	Unknown	Bioassay, MALDI-TOF	<b>This study</b>
<i>Laagowema quadripunctulatum</i>		X	Unknown	Bioassay	ZAGATTO et al. 1998
<i>Lyngbya hieronymusii</i>		X	Unknown	Bioassay, HPLC, MALDI-TOF	<b>This study</b>
<i>L. cf. robusta</i>		X	Unknown	Bioassay, HPLC, MALDI-TOF	<b>This study</b>
<i>Plankolyngbya cf. teilingii</i>		X	Saxitoxins	Bioassay, HPLC, MALDI-TOF	<b>This study</b>
<i>Plankothrix agardhii</i>	X	X	Microcystin	Bioassay, HPLC, LC-MS	JARDIM et al. 2004a, 2004b; ANOS et al. 2006
<i>P. isothrix</i>		X	Microcystins	Bioassay, HPLC	MAIZONAVE et al. 2004 (as <i>P. mougeotii</i> ); CORSAN (unpublished); DMAE (unpublished)
<i>Pseudanabaena limnetica</i>		X	Unknown	Bioassay	ZAGATTO et al. 1998
<i>Tychonema sp.</i>		X	Unknown	Bioassay, MALDI-TOF	<b>This study</b>

Nostocales				
<i>Anabaena circinalis</i>		X	Microcystin, Bioassay, AchE Anatoxin-a (S), Inhibition, HPLC Gonyautoxin	WERNER et al. 2000; YUNES et al. 2000; SAMAE (unpublished)
<i>A. crassa</i>		X	Microcystin, Bioassay, Anatoxin-a (S) AchE Inhibition	BECKER et al. 2004, 2006; CORSAN (unpublished)
<i>A. planctonica</i>		X	Microcystin Bioassay, HPLC	CORSAN (unpublished)
<i>A. spiroides</i>		X	Anatoxin-a (S) Bioassay, HPLC, AchE inhibition	WERNER et al. 2000; YUNES et al. 2000; MONSERIAT et al. 2001
<i>A. verrucosa</i>		X	Anatoxin-a HPLC	LEMES et al. 2004
<i>Anabaena</i> sp. (as <i>A. spiroides</i> )	X		Anatoxin-a (S) Bioassay	MOLICA et al. 2005
<i>Aphanizomenon</i> cf. <i>gracile</i>	X		Similar to microcystin HPLC	VIEIRA et al. 2005
<i>A. istatschenkoi</i>		X	Saxitoxins Bioassay, HPLC	CORSAN (unpublished)
<i>Cylindrospermopsis</i> <i>raciborskii</i>	X	X	Saxitoxins, neurosaxitoxin Bioassay, HPLC	BOUVY et al. 1999; LAGOS et al. 1999; NASCIMENTO et al. 2000; YUNES et al. 2000; JARDIM et al. 2000, 2001a; COPASA (unpublished); MOLICA et al. 2002; JARDIM & VIANA, 2003; MORALES 2003; YUNES et al. 2003; FERNANDES et al. 2005; ANTOS et al. 2006; COSTA et al. 2006; GRELLMANN 2006; CORSAN (unpublished); SAMAE (unpublished)
<i>Raphidiopsis brookii</i>		X	Saxitoxins Bioassay, HPLC	<b>This study</b>



# Alterações na legislação sobre as normas de potabilidade da água

Mudanças na legislação correspondente as normas de potabilidade da água para consumo humano no Brasil.


Homologação da  
Portaria 1469/00/MS

Ministério  
da saúde

Monitoramento de  
cianobactérias e  
cianotoxinas

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL  
15 de Novembro de 1889

- Obrigatoriedade na análise de microcistina e recomendação na análise de saxitoxinas e cilindrospermopsina.

The background of the slide features the official coat of arms of Brazil. It consists of a central five-pointed star with a blue field containing white stars, surrounded by a green wreath of coffee and tobacco branches. Below the star is a blue ribbon with the text 'REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL' and '15 de Novembro de 1889'.

Toxinas analisadas	VMP
Microcistina	1.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Saxitoxina	3.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$
Cilindrospermopsina	15.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ *





MINISTÉRIO DA SAÚDE

PORTARIA N.º 518, DE 25 DE MARÇO DE 2004

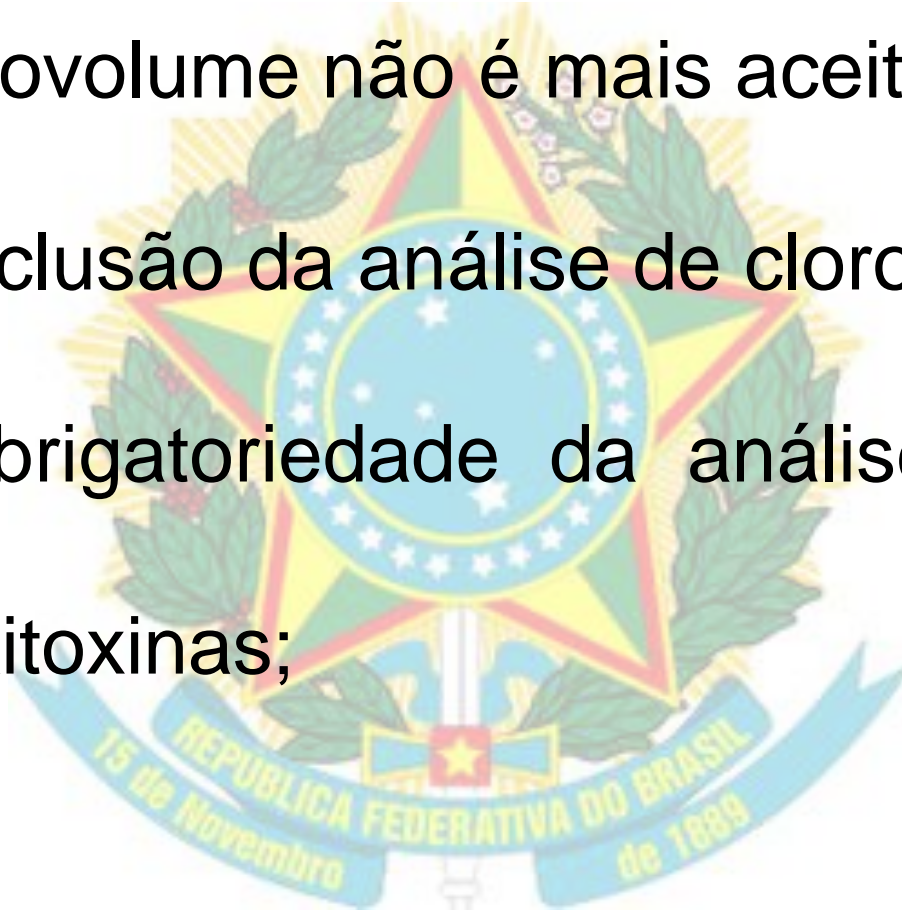
Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

Transferência de competências (FUNASA ⇒ SVS)



# Portaria 2.914/11/MS

- Biovolume não é mais aceito;
- Inclusão da análise de clorofila;
- Obrigatoriedade da análise de saxitoxinas;





# AÇÕES DA FUNASA

DENSP/DESAM - estruturação e implantação da metodologia de contagem de cianobactérias nos laboratórios das Unidades regionais de controle da qualidade da água – URCQAs.

CONTRATAÇÃO DE 09 (NOVE) PRODUTOS  
ENTRE JULHO/2010 e MAIO/2012 - OPAS

# 1º CONTRATO - JULHO/2010 a JUNHO/2011

**Aprovado**

**CONTRATO DE SERVIÇOS**

**BR/CNT/1001054.001**

**ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE**  
**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**

Setor de Embaixadas Norte, Lote 19

Brasília, DF, 70800-400 Brasil

Tel.:+55 61 34269595 Fax:+55 61 4269591 Email:postmaster@bra.ops-oms.org CNPJ: 04.096.431/0001-54

A Organização Pan-Americana da Saúde, Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), localizada no Setor de Embaixadas Norte, Lote 19, Brasília, DF, 70800-400, Brasil, representada por **DIEGO VICTORIA** e **GIULLIARI ALAN DA SILVA TAVARES DE LIRA** (doravante denominado Contratado), CPF: 027.002.524-38, com sede em Rua Copacabana 132 A, Bairro Boa Viagem, te.: (81) 9141-4591, Recife, PE, 51030-590, através do presente instrumento acordam com o que segue:

- 1 - Documento técnico apresentando proposta de capacitação para técnicos da FUNASA sobre metodologia taxonômica de contagem de cianobactérias;
- 2 - Documento técnico apresentando avaliação da qualidade da água dos mananciais superficiais que abastecem aldeias indígenas quanto à presença de cianobactérias, na região nordeste I (estados do PE, PB, MA);
- 3 - Documento técnico apresentando avaliação da qualidade da água dos mananciais superficiais que abastecem aldeias indígenas quanto a presença de cianobactérias, na região nordeste II (estados do AL, BA, CE);
- 4 - Documento técnico apresentando avaliação da qualidade da água quanto a presença de cianobactérias dos mananciais superficiais de municípios com serviços autônomos de abastecimento de água, na região nordeste III (PI, RN e SE);
- 5 - Documento técnico apresentando avaliação da qualidade da água dos mananciais superficiais que abastecem aldeias indígenas quanto à presença de cianobactéria, na região sudeste I (RJ e ES).





International  
Water  
Resources  
Association



Water and  
Energy  
Resources  
Secretariat



## CERTIFICADO / CERTIFICATE

A Associação Internacional de Recursos Hídricos - IWRA e a Secretaria de Recursos Hídricos e Energéticos do Estado de Pernambuco - SRHE certificam que

*The International Water Resources Association - IWRA and the Water and Energy Resources Secretariat of Pernambuco State - SRHE certify that*

**Giulliar Alan Da Silva Tavares De Lira**

apresentou no XIV IWRA Congresso Mundial da Água, realizado de 25 a 29 de Setembro de 2011, em Porto de Galinhas – PE, Brasil, o trabalho “PLANO DIDÁTICO PARA IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS NOS LABORATÓRIOS DAS URCQAS/FUNASA”, PAP005702, de autoria de:

*has presented at the XIV IWRA World Water Congress, held in Porto de Galinhas – PE, Brazil, from September 25 to 29, 2011, the paper “PLANO DIDÁTICO PARA IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISES QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE CIANOBACTÉRIAS NOS LABORATÓRIOS DAS URCQAS/FUNASA”, PAP005702, by:*

Giulliar Alan Da Silva Tavares De Lira, Alba Lemos De Oliveira, Eliane Lopes Borges, Maria De Fátima De Vasconcelos Silva, Osman De Oliveira Lira, Vilma Ramos Feitosa.

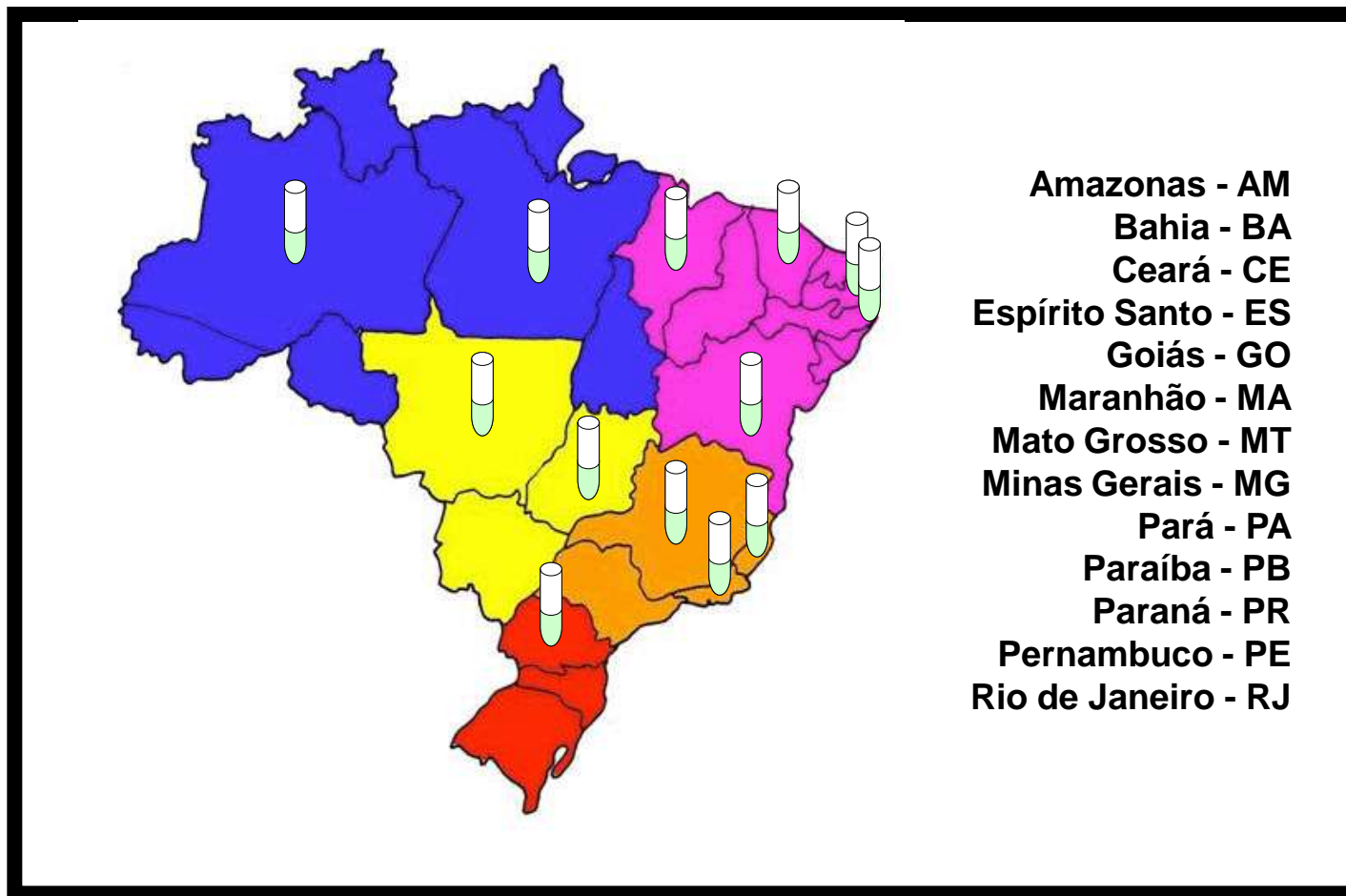
Porto de Galinhas, 29 de Setembro de 2011  
Porto de Galinhas, September 29th, 2011

Prof. Jun Xia  
Presidente da IWRA  
President of IWRA

Prof. Christopher Scott  
Presidente do Comitê Científico  
Chair of Scientific Committee

Prof. José Almir Cirilo  
Presidente do Comitê Organizador Local  
Chair of Local Organizing Committee

**Público alvo:** técnicos de nível superior com formação em biologia ou áreas afins, dos laboratórios das URCQA's/FUNASA.



Distribuição dos 13 (treze) laboratórios das Unidades Regionais de Controle da Qualidade da Água – URCQAs/ FUNASA no Brasil.



**Curso de 40h**

```
graph TD; A[Curso de 40h] --> B[Teóricas]; A --> C[Práticas]; B --> D[Utilização de recursos audiovisuais e simulação de práticas microscópicas com material didático]; C --> E[Campo]; C --> F[Laboratório]; E --> G[Coleta em manancial de Abastecimento]; F --> H[Análises qualitativa e quantitativa de cianobactérias];
```

**Teóricas**

**Utilização de recursos audiovisuais e simulação de práticas microscópicas com material didático**

**Práticas**

**Campo**

**Coleta em manancial de Abastecimento**

**Laboratório**

**Análises qualitativa e quantitativa de cianobactérias**

## Objetivos:

- Viabilizar autonomia quanto ao diagnóstico de cianobactérias para FUNASA;
- Atender às normas de monitoramento de cianobactérias em mananciais de abastecimento público de acordo com as exigências especificadas na portaria 518/04/MS (na ocasião);
- Possibilitar através do diagnóstico de cianobactérias em mananciais superficiais de abastecimento a percepção de riscos eminentes à saúde pública;



# 1. **Características gerais de ecossistemas dulcícolas**

1.1 O ambiente dulcícola

1.2 Comunidades planctônicas

1.3 A influência externa no ambiente aquático

## 2. **O Plâncton**

2.1 Características do Plâncton

## 3. **O fitoplâncton**

3.1 Características gerais

3.2 Chlorophyceae

3.3 Zygnematomyceae

3.4 Euglenophyceae

3.5 Bacillariophyceae

3.6 Dinophyceae

3.7 Chrysophyceae

3.8 Cryptophyceae

## 4. O que são **cianobactérias**?

4.1 Semelhanças e diferenças entre cianobactérias e bactérias

### 4.2 **Cianobactérias ou Cyanophyceae**

4.2.1 Características Gerais

4.2.2 **Classificação de Cyanobacteria**

### 4.3 **Florações de cianobactérias**

### 4.4 **características gerais das cianotoxinas**

## 5. **Coleta de cianobactérias**

5.1 Equipamentos e ferramentas de amostragem

5.2 Soluções de preservação

5.3 Procedimento de coleta

5.4 Transporte e armazenamento de amostras

## 6. **Análise Qualitativa**

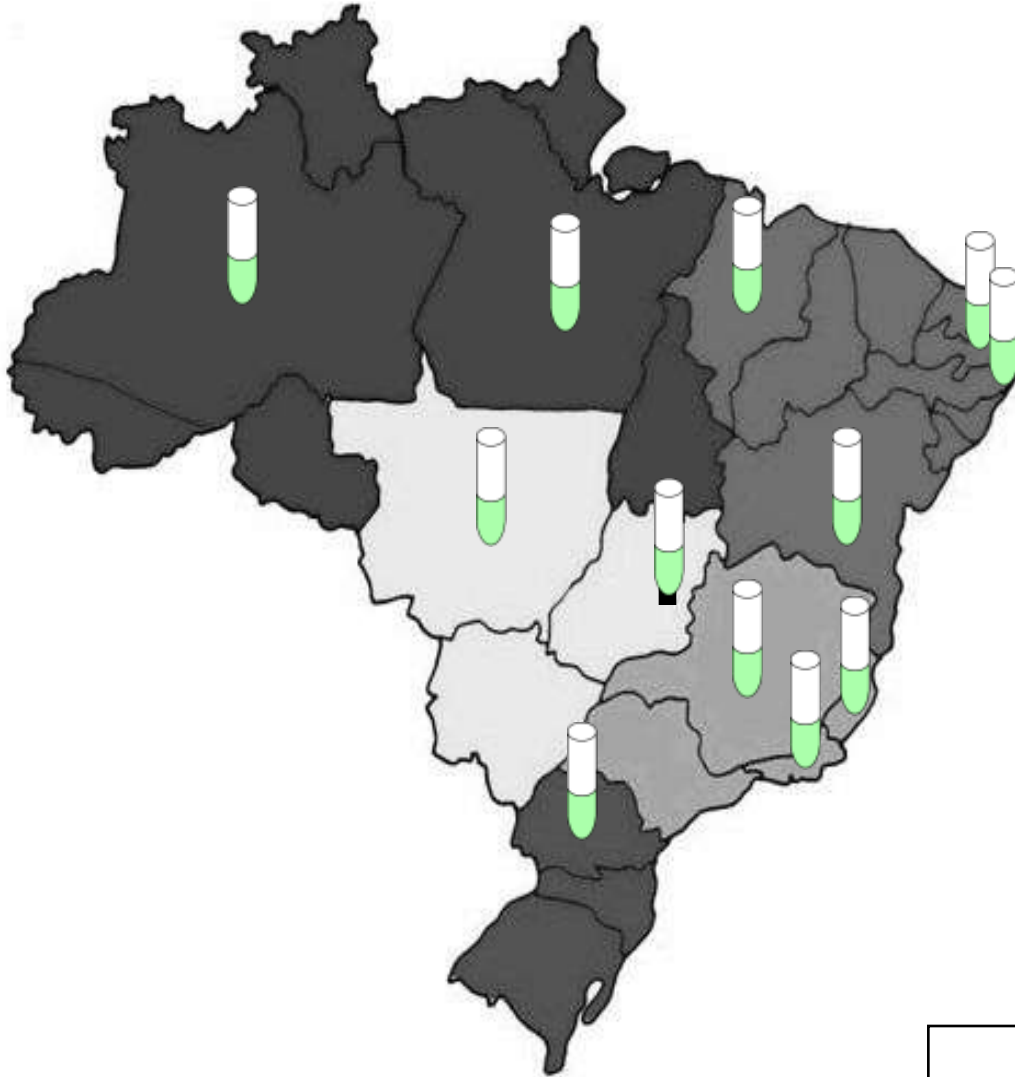
## 7. **Análise quantitativa**

7.1 Cálculo da densidade de cianobactérias

## 8. **Legislação**

Abordagem  
didática

# Aplicação do curso para técnicos das URCQAs de 11 estados e DF.



## 1° curso

DF (01)

PE (01)

MA (01)

BA (01)

RJ (01)

## 2° curso

AM (01)

PA (01)

ES (01)

PE (01)

PB (01)

DF (01)

## 3° curso

BH (01)

AM (01)

ES (01)

PE (01)

PB (01)

## 4° curso

SC (01)

SP (01)

MT (01)

PB (01)

DF (01)

PE (01)

Capacitação de 19 técnicos



# **Avaliação da qualidade da água dos mananciais superficiais que abastecem aldeias indígenas e municípios com SAAE.**

Regiões:

Nordeste I (PE, PB, MA)

Nordeste II (Al, BA e CE)

Nordeste III (PI, RN e PI\*)

Sudeste I (RJ e ES)

\* O estado do PI não foi contemplado.



International  
Water  
Resources  
Association



XIV World Water  
CONGRESS  
Realizado em Recife, PE, Brasil  
17 a 21 de Setembro de 2011

Water and  
Energy  
Resources  
Secretariat



## CERTIFICADO / CERTIFICATE

A Associação Internacional de Recursos Hídricos - IWRA e a Secretaria de Recursos Hídricos e Energéticos do Estado de Pernambuco - SRHE certificam que

*The International Water Resources Association - IWRA and the Water and Energy Resources Secretariat of Pernambuco State - SRHE certify that*

### Giulliarí Alan Da Silva Tavares De Lira

apresentou no XIV IWRA Congresso Mundial da Água, realizado de 25 a 29 de Setembro de 2011, em Porto de Galinhas – PE, Brasil, o trabalho "AVALIAÇÃO PONTUAL QUANTO A PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS EM MANANCIAS SUPERFICIAIS UTILIZADOS PARA ABASTECIMENTO DE ALDEIAS INDÍGENAS E MUNICÍPIOS COM SERVIÇOS AUTÔNOMOS DE FORNECIMENTO DE ÁGUA, DE ESTADOS DO NORDESTE DO BRASIL.", PAP005704, de autoria de:

*has presented at the XIV IWRA World Water Congress, held in Porto de Galinhas – PE, Brazil, from September 25 to 29, 2011, the paper "AVALIAÇÃO PONTUAL QUANTO A PRESENÇA DE CIANOBACTÉRIAS EM MANANCIAS SUPERFICIAIS UTILIZADOS PARA ABASTECIMENTO DE ALDEIAS INDÍGENAS E MUNICÍPIOS COM SERVIÇOS AUTÔNOMOS DE FORNECIMENTO DE ÁGUA, DE ESTADOS DO NORDESTE DO BRASIL.", PAP005704, by:*

Giulliarí Alan Da Silva Tavares De Lira, Alba Lemos de Oliveira, Eliane Lopes Borges, Maria de Fatima de Vasconcelos Silva, Osman de Oliveira Lira, Vilma Ramos Feltosa.

Porto de Galinhas, 29 de Setembro de 2011  
Porto de Galinhas, September 29th, 2011

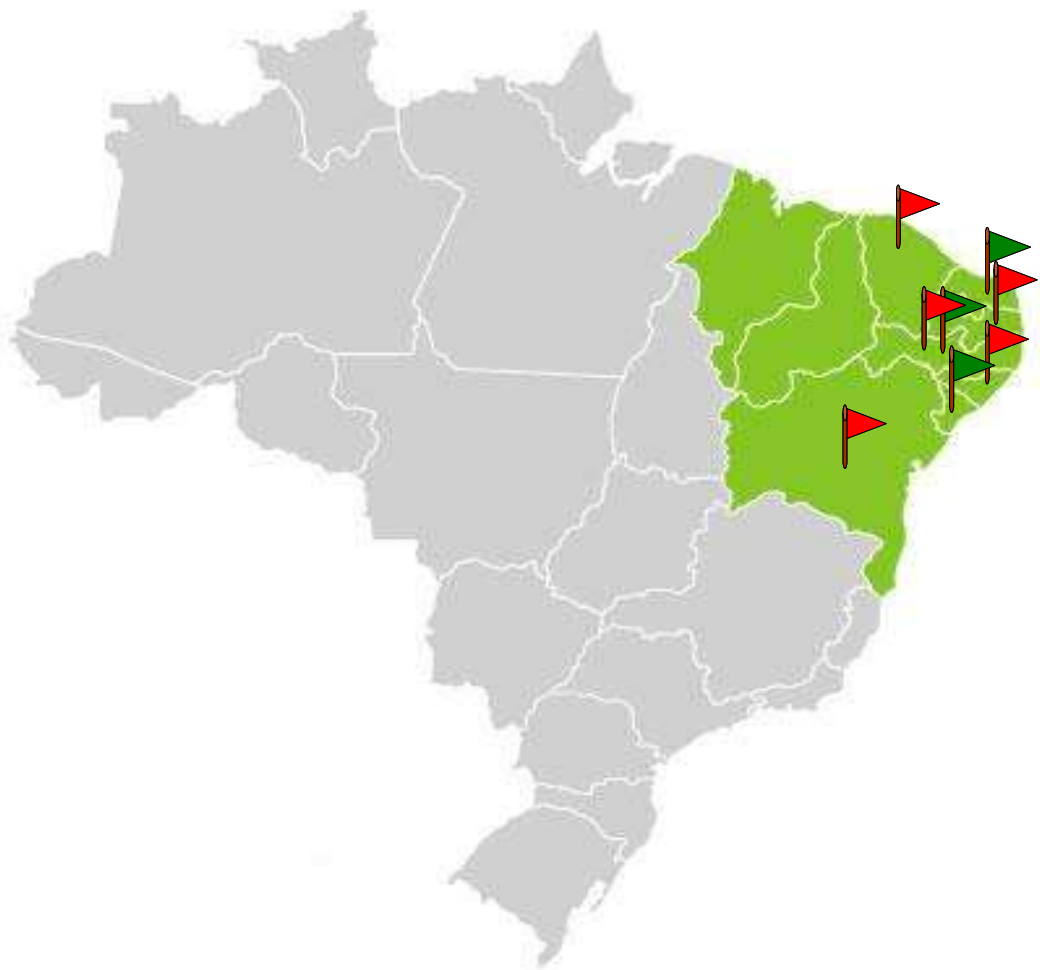
Prof. Jun Xie  
Presidente da IWRA  
President of IWRA

Prof. Christopher Scott  
Presidente do Comitê Científico  
Chair of Scientific Committee

Prof. José Almir Cirilo  
Presidente do Comitê Organizador Local  
Chair of Local Organizing Committee



Foram contemplados 45 (quarenta e cinco) mananciais superficiais de abastecimento: 28 (vinte e oito) utilizados em aldeias indígenas e 17 (dezesete) em municípios com serviços autônomos de água e esgoto – SAAE (07 estados do nordeste).



### **Aldeias indígenas**

**Pernambuco (10 mananciais)**

**Paraíba (01 manancial)**

**Alagoas (06 mananciais)**

**Ceará (06 mananciais)**

**Bahia (05 mananciais);**



### **SAAE**

**Pernambuco (07 mananciais)**

**Rio Grande do Norte (03 mananciais)**

**Sergipe (07 mananciais).**

Taxons total	Pernambuco	Paraíba	Alagoas	Ceará	Bahia	R. G. Norte	Sergipe
Cyanobacteria							
Chroococcales							
Chroococaceae							
<i>Chroococcus limneticus</i> Lemmermann	X				X		
<i>Chroococcus minimus</i> (Keitsler) Lemmermann	X		X		X		X
<i>Chroococcus minutus</i> (Kütz.) Näg.	X		X	X	X	X	X
<i>Chroococcus turgidus</i> (Kützing) Nägeli				X		X	
Gomphosphaeriaceae							
<i>Gomphosphaeria</i> sp.				X		X	
Merismopediaceae							
<i>Aphanocapsa delicatissima</i> West & G.S.West	X		X	X		X	
<i>Aphanocapsa incerta</i> (Lemmermann) Cronberg & Komárek			X	X		X	
<i>Aphanocapsa</i> sp.		X				X	X
<i>Coelibomon</i> sp.						X	
<i>Eucapsis densa</i> Azevedo							X
<i>Merismopedia glauca</i> (Ehrenberg) Kützing						X	
<i>Merismopedia minima</i> Beck				X		X	X
<i>Merismopedia punctata</i> Meyen				X			
<i>Merismopedia tenuissima</i> Lemmermann						X	
<i>Woronichinia</i> sp.				X			
Microcystaceae							
<i>Microcystis</i> sp.				X			
<i>Synechocystis aquatilis</i> Sauvageau, Bull.	X		X	X	X		X
Synechococcaceae							
<i>Synechococcus</i> sp.	X						
<i>Synechococcus</i> sp.	X		X	X	X	X	X
<i>Synechococcus</i> sp.	X		X	X	X	X	X
Oscillatoriales							
Borziaceae							
<i>Oscillatoria princeps</i> Vaucher ex Gomont	X		X	X		X	
<i>Oscillatoria</i> sp.	X		X		X	X	
Rhodamniaceae							
<i>Rhodamnia</i> sp.	X						
Geletrinema sp.	X		X				X
<i>Geletrinema splendendum</i> (Greville) Anagnostidis	X		X				X
<i>Planctothrix agardhii</i> (Gomont) Anagnostidis & Komárek			X			X	
<i>Planctothrix</i> sp.			X				X
<i>Planctolyngbya minor</i> (Geitler & Rutner) Komárek & Cronberg				X			
<i>Planctolyngbya</i> sp.	X	X	X	X	X	X	X
<i>Pseudanabaena catenata</i> Lauterborn	X	X	X	X	X		X
<i>Pseudanabaena galeata</i> Böchner	X		X	X			
<i>Pseudanabaena moniformis</i> Komárek & H.J. Kling							X
<i>Romeria gracilis</i> Koczwara	X			X	X	X	
<i>Spirulina</i> sp.						X	X
Nostocales							
Nostocaceae							
<i>Anabaena constricta</i> (Szafer) Geitler	X						
<i>Anabaena planctonica</i> Brunth., Siltz, Ak. Wiss. Wien		X	X	X		X	
<i>Anabaena</i> sp.1	X		X			X	X
<i>Anabaena</i> sp.2	X		X				
<i>Anabaena</i> sp.3	X						
<i>Anabaenopsis</i> sp.	X						
<i>Aphanizomenon gracile</i> Lemmermann			X	X			X
<i>Aphanizomenon</i> sp.			X				
<i>Cylindrospermopsis catemaco</i> J. Komárková-Legnerová & R.Tavera	X			X			
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Woloszynska) Seenayya & Subba Rao	X		X	X		X	
<i>Raphidiopsis curvata</i> Fritsch et Richt.	X						
<i>Raphidiopsis mediterranea</i> Skuja				X		X	
<i>Raphidiopsis</i> sp.				X			
Hapalosiphonaceae							
<i>Hapalosiphon</i> sp.					X		
<i>Nostochoopsis</i> sp.					X		

## 50 táxons identificados:

- Pernambuco (27 spp.)
- Ceará (24 spp.)
- Rio Grande do Norte (24 spp.)
- Alagoas (21 spp.)
- Sergipe (18 spp.)
- Bahia (14 spp.)
- Paraíba (04 spp.)

PE, PB, BA e SE < 20.000 cél.mL;

AL e CE com florações de cianobactérias (necessidade de monitoramento semanal para as cianotoxinas).

07 (sete) táxons presentes em mais de 90% dos mananciais são comprovadamente produtores de florações tóxicas no Brasil, reforçando a necessidade de implantação de planos de monitoramento contínuos nestes ambientes.

# 3º CONTRATO - DEZEMBRO/2011 a MAIO/2012

**ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE**  
**ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE**

Setor de Embaixadas Norte, Lote 19

Brasília, DF, 70800-400 Brasil

Tel.:+55 61 34269595 Fax:+55 61 4269591 Email:postmaster@bra.ops-oms.org CNPJ: 04.096.431/0001-54

**Aprovado**  
**CONTRATO DE SERVIÇOS**  
**BR/CNT/1101725.001**

A Organização Pan-Americana da Saúde, Escritório Regional da Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS), localizada no Setor de Embaixadas Norte, Lote 19, Brasília, DF, 70800-400, Brasil, representada por **DIEGO VICTORIA** e **GIULLIARI ALAN DA SILVA TAVARES DE LIRA** (doravante denominado Contratado), CPF: 027.002.524-38, com sede em Rua Copacabana 132 A, Bairro Boa Viagem, te.: (81) 9141-4591 e 3461-1574, Recife, PE, 51030-590, através do presente instrumento acordam com o que segue:

**1. Alcance dos Serviços:** O Contratado assume a realização dos seguintes serviços e/ou entrega dos seguintes produtos (doravante denominados Serviços) à OPAS/OMS, de acordo com as etapas ou fases de execução aqui especificadas e com os termos e condições do presente Contrato.

1 Documento técnico apresentando informações para o desenvolvimento de um guia prático com conteúdo sobre a implantação de um laboratório básico para análise qualitativa e quantitativa de cianobactérias.

2 Documento técnico apresentando informações para o desenvolvimento de um guia prático com conteúdo para auxílio da identificação de cianobactérias (análise qualitativa).

3 Documento técnico apresentando informações para o desenvolvimento de um guia prático com conteúdo para calibração de microscópios e instrumentos (cubetas de contagem) utilizados na análise quantitativa de cianobactérias, incluindo "kit teórico-prático" com objetivo didático, para o desenvolvimento de cursos.



## Objetivo

Orientar a implantação do diagnóstico qualitativo e quantitativo de cianobactérias para profissionais dos laboratórios das Unidades regionais de controle da qualidade da água – URCQAs/FUNASA, com a apresentação da descrição de equipamentos e dos procedimentos de análise.

## 1. Estrutura do laboratório

Para implantação de qualquer diagnóstico em um laboratório, independente que este mantenha ou não, uma rotina de análises de controle de qualidade da água, deve-se atentar para o estabelecimento de um fluxo da amostra, desde o seu recebimento até a expressão dos resultados. Nesse sentido, um laboratório para análise qualitativa e quantitativa de cianobactérias deve apresentar a seguinte estrutura:

- 1.1 Ambiente para recepção, registro de amostras e emissão dos resultados;
- 1.2 Ambiente para acondicionamento e processamento de amostras;
- 1.3 Ambiente de análises microscópicas;



**Figura 1.** Vista parcial da disposição de microscópios na bancada de uma sala de microscopia.

## 2. Equipamentos e acessórios para coleta de amostras

Uma coleta de material biológico necessita de equipamentos ou instrumentos adequados ao diagnóstico, nesse sentido um laboratório de cianobactérias deve apresentar aparelhamentos compatíveis para tal amostragem, os quais também atendem à coleta para análise de qualquer grupo fitoplanctônico.

### a) Rede de plâncton (Figura 2)

As redes de plâncton são mais conhecidas na sua forma cônica com abertura circular, apesar de existirem outras formas como a cilíndrica-cônica e com aberturas quadrada ou retangular. As redes apresentam um recipiente de coleta terminal (final da rede) que armazena todo o material filtrado. Podem ser utilizadas para o estudo quantitativo de organismos zooplanctônicos, bem como, fitoplanctônicos, desde que o volume filtrado seja determinado (conhecido). Para o fitoplâncton sua utilização está mais adequada ao estudo qualitativo. Constituída por um tecido filtrante de nylon com diferentes aberturas de poro (calibração da malha), as redes selecionam e concentram os organismos de acordo com suas dimensões, sendo para o fitoplâncton recomendado malhas de 20 a 25  $\mu\text{m}$  (micrômetros). As amostras são obtidas através de arrastos que podem ocorrer horizontalmente, verticalmente ou de forma oblíqua (diferentes angulações). Deve-se antes da amostragem lavar a rede com a água do próprio ambiente de coleta.



Figura 2. Vista parcial da rede de plâncton durante procedimento de coleta



Figura 3. A e B: Vista do momento de preparação e recolhimento da garrafa de Van Dorn.



### 3. Equipamentos e acessórios para o diagnóstico qualitativo e quantitativo de cianobactérias

Para implantação de um laboratório qualitativo e quantitativo de cianobactérias não é necessário a aquisição de muitos equipamentos, sendo possível obter bons resultados com um mínimo de aparelhamento. No entanto, deve-se atentar a qualidade destes e sempre tentar adquirir aqueles que proporcionariam melhores resultados.

17

#### a) **Microscópio biológico binocular ou trinocular** (Figura 6)

O microscópio biológico binocular ou trinocular é um equipamento essencial para o diagnóstico de cianobactérias, podendo ser utilizado tanto para a análise qualitativa (sendo esta sua principal função) como para quantitativa, dependendo do método empregado. Toda a etapa relacionada à identificação das espécies (ou seja, análise qualitativa) depende de observações em microscópio biológico comum, sendo realizadas medições das células, desenhos esquemáticos das espécies e de suas estruturas morfológicas, além de anotações sobre outros aspectos morfofisiológicos essenciais para definição dos táxons. O microscópio biológico comum pode ser utilizado em análises quantitativas através do método com câmara de Sedwick Rafter, o qual é amplamente aceito e proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em sua publicação (Chorus e Bartram, 1999). Para aquisição de um microscópio com a especificação citada, no momento da compra, deve-se ter a atenção para solicitação de alguns acessórios indispensáveis: retículo micrométrico ou micrometrado para acoplar na ocular, retículo de Wippler para acoplar na ocular e lâmina micrométrica para calibração das objetivas. Outros acessórios podem ainda acrescentar muita qualidade as análises, como a câmara clara e sistemas de captura de imagens, sendo este último para microscópio biológico trinocular.



Figura 6. Microscópio biológico trinocular com sistema de captura de imagem.



Figura 7. Microscópio invertido invertido trinocular.

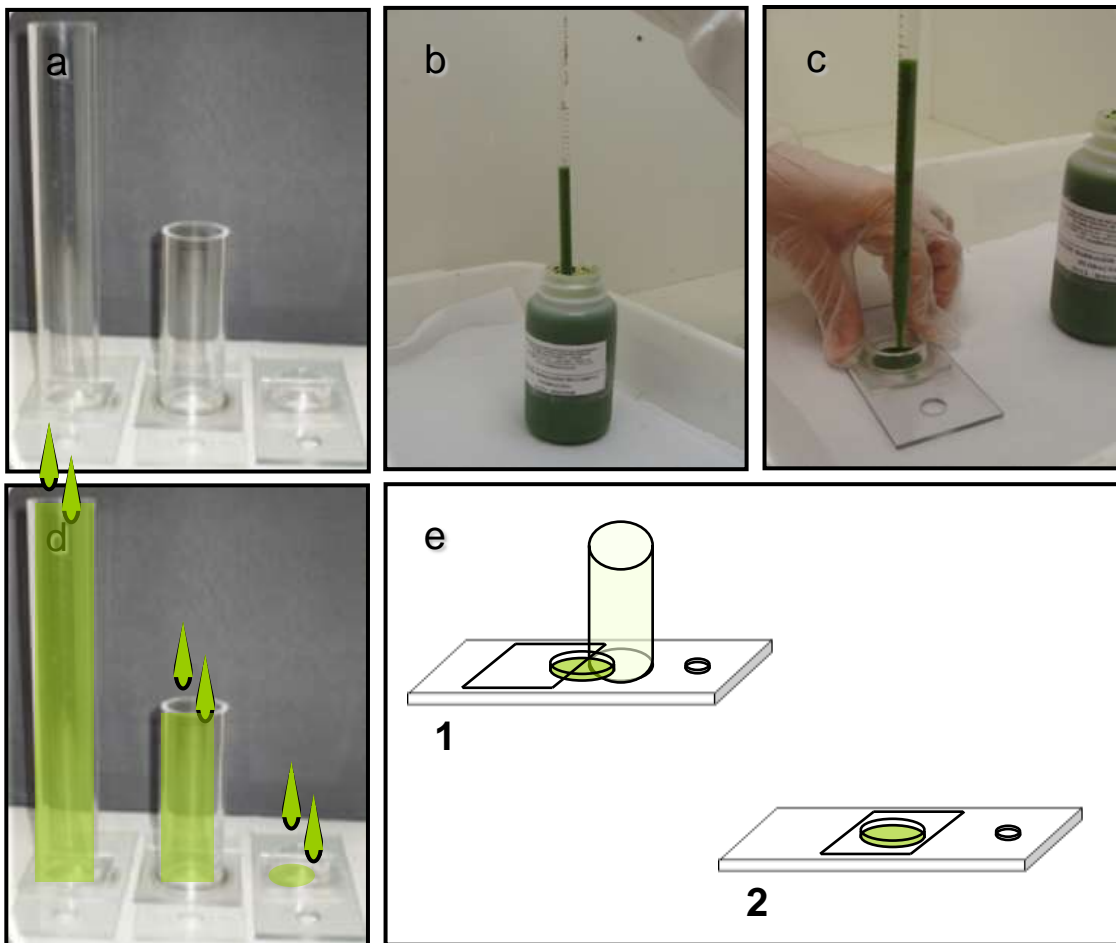


Figura 8 - Representação do procedimento de sedimentação de amostras.

## Objetivo

Orientar e auxiliar a execução do diagnóstico qualitativo de cianobactérias, e consequentemente o quantitativo, para profissionais dos laboratórios das Unidades regionais de controle da qualidade da água – URCQAs/FUNASA, apresentando uma ferramenta que estabelece alguns parâmetros que facilitam o reconhecimento de cianobactérias.



## 1. O que são cianobactérias?

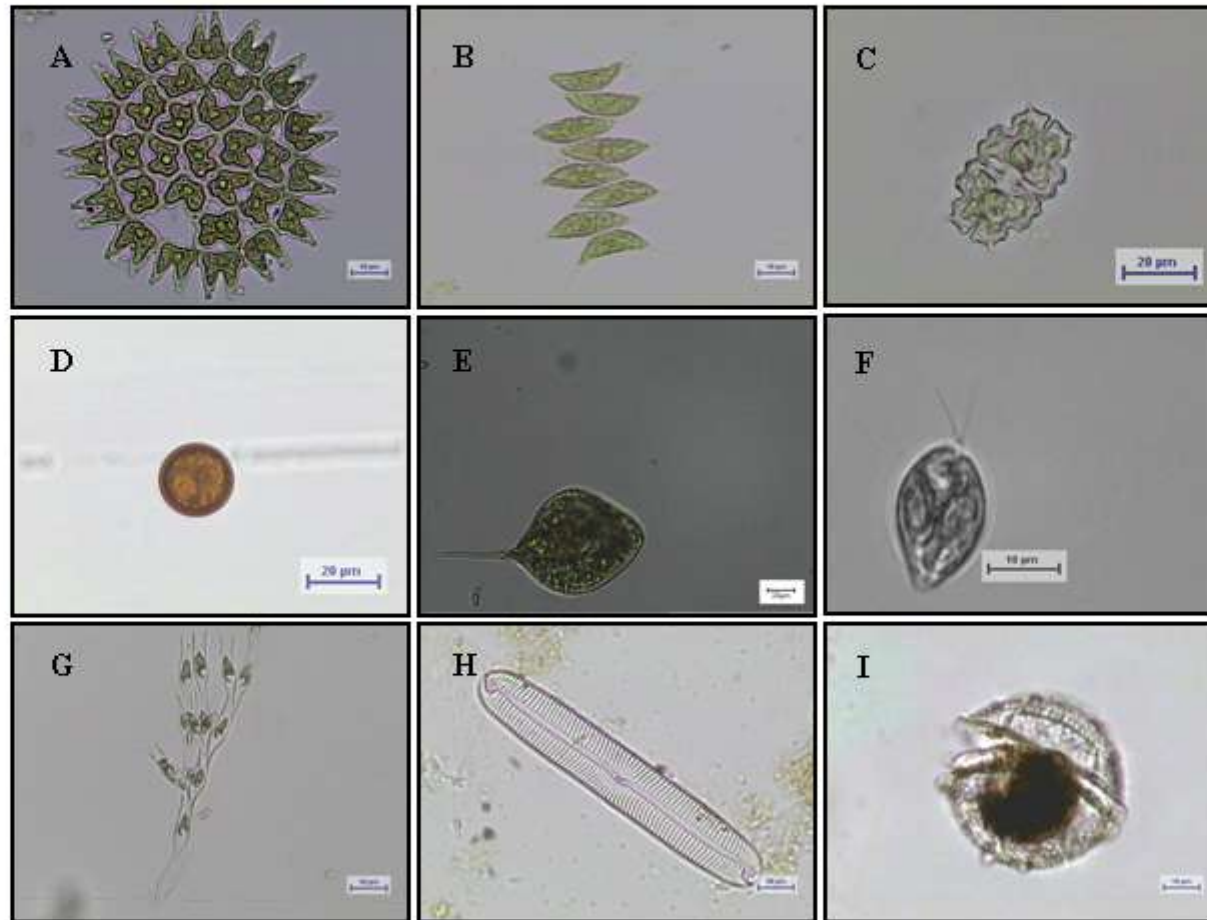
Para dar início ao estudo qualitativo de cianobactérias é necessário fundamentar o grupo em questão, sendo assim, Cyanophyta, Cianofíceas, Cyanophyceae, algas azuis (devido a sua pigmentação), entre outras denominações, as cianobactérias dentro de uma conceituação bastante generalizada são organismos geralmente microscópicos, uni ou pluricelulares, procariontes e fotossintetizantes (com “clorofila a”). Diante de suas características pode-se dizer que estruturalmente e fisiologicamente as cianobactérias assemelham-se as bactérias e, funcionalmente, estão mais próximas das plantas dos sistemas aquáticos. Devido a essas constatações tais organismos são sistematicamente classificados em dois importantes grupos: a botânica, considerados vegetais procariontes, pertencem à Divisão Cyanophyta de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica – ICBN, e a bacteriologia, considerados bactérias fotossintetizantes, com clorofila  $\alpha$  e produção de  $O_2$ , pertencentes à Divisão Cyanobacteria (Cavalier-Smith, 2002) de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Bacteriana – ICNB, (1980).

### Características gerais

- As cianobactérias não apresentam núcleo definido e organelas, o que as constituem como seres procariontes; não apresentam flagelos e não se reproduzem sexualmente. Fazem fotossíntese utilizando a “clorofila  $a$ ” e produzem oxigênio no final do processo, de forma semelhante às plantas. Algumas ordens apresentam células especializadas (heterócito e acinetos) diferente das vegetativas;
- Acredita-se que as cianobactérias tiveram origem há pelo menos 3,5 bilhões de anos e figuram-se entre os primeiros seres vivos que apareceram na Terra, sendo-lhes atribuída a responsabilidade

## 2. Comunidade fitoplanctônica

Para dar início ao estudo qualitativo das cianobactérias, o pesquisador deve sempre levar em consideração que estes organismos serão observados juntamente a outros grupos fitoplanctônicos como, clorófitas, diatomáceas, euglenas, dinoflagelados, entre outros, no qual a este conjunto de algas denomina-se, “comunidade fitoplanctônica” (Figura 1).



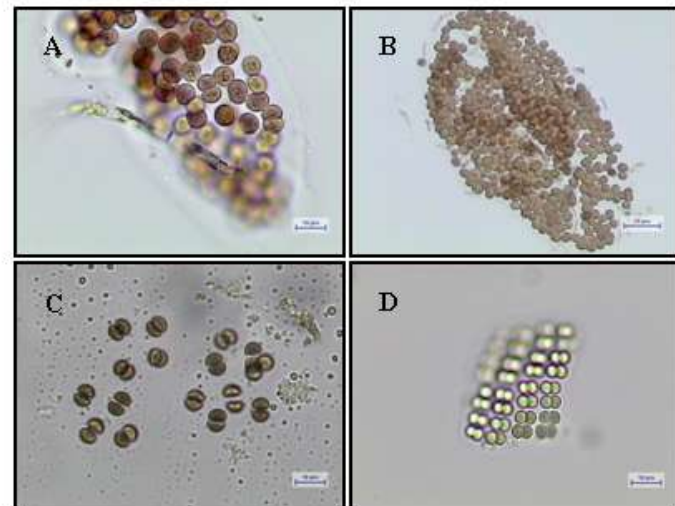
**Figura 1.** Representantes de diversos grupos fitoplanctônicos: **Chlorophyceae:** A - *Pediastrum duplex* Meyen; B - *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat; **Zygnematophyceae:** C - *Euastrum bidentatum* Nägeli; **Euglenophyceae:** D - *Trachelomonas volvocina* Ehrenberg; E - *Phacus longicauda*

## 2.8 Cianobactérias

Em função das características morfofisiológicas dos táxons é possível diferenciar entre as cianobactérias, subgrupos que variam de acordo com o sistema de classificação utilizado. Para o presente trabalho foi adotado o sistema de classificação de Komárek e Anagnostidis, que diferenciam as cianobactérias em quatro (04) subgrupos ou ordens, sendo estes: Chroococcales, Oscillatoriales, Nostocales e Stigonematales:

### 2.8.1 Chroococcales (Figura 2)

- Unicelulares, coloniais ou pseudofilamentosas (filamentos não verdadeiros, sem conexão entre as células);
- Células cocóides (cilíndricas, ovóides, esféricas);
- Divisão celular em 1 (um), 2 (dois) ou mais planos perpendiculares;
- Podem ser planctônicas, bentônicas, terrestres ou sub-aerofíticas;
- As células (individualmente) ou um grupo de células (colônias) podem apresentar envoltório mucilaginoso ou sistemas de hastes mucilaginosas.



**Figura 2.** **A e B** - Microcystis wesenbergii (Komárek) Komárek, **C** - Chroococcus sp.; **D** - Merismopedia glauca (Ehrenberg) Kützing. Fotos dos arquivos do laboratório de microalgas da UFRPE.



### 3. Análise Qualitativa

A análise qualitativa consiste na identificação de espécies e baseia-se na observação das características morfofisiológicas, acrescido da medição dos organismos e de algumas de suas estruturas. A seguir veremos os equipamentos, acessórios e substâncias, essenciais ou não, utilizados durante o procedimento de análise qualitativa das cianobactérias, assim como, a indicação de algumas importantes características citológicas, morfológicas, estruturais e morfométricas para definição dos táxons, os quais serão pormenorizados no item 4, indicado ao reconhecimento das estruturas e termos para identificação de cianobactérias:

#### A) Equipamentos e acessórios

- Microscópio óptico binocular;
- Centrífuga;
- Reticulo micrométrico acoplado a ocular (acessório acoplado a ocular do microscópio);
- Câmara clara (acessório acoplado ao microscópio);
- Câmara fotográfica (acessório acoplado ao microscópio);
- Sistema de epifluorescência (acessório acoplado ao microscópio);
- Caixas de lâminas e lamínulas;
- Pipetas Pasteur (não estéril).

#### B) Características Taxonômicas

- Disposição ou arranjo celular (unicelulares, coloniais ou filamentos):

#### Organismos unicelulares ou coloniais

- Formas e medidas celulares (comprimento, largura ou diâmetro); plano de divisão celular; arranjo celular (enfileiradas, agregadas, frouxas etc.); presença, forma, textura e arranjo da mucilagem; presença, forma e disposição de hastes mucilaginosas; conteúdo celular (granuloso, presença de aerótopos etc.); etc.

#### D) Procedimento de análise

O procedimento para análise qualitativa é bastante simples e consiste na análise da amostra em microscópio biológico com o auxílio de um conjunto de lâmina e lamínula (Figura 6). Devem-se colocar diretamente algumas gotas da amostra na lâmina e sobrepor a lamínula, ou ainda, realizar leve centrifugação da amostra ou acomodá-la em tubos cônicos para maior concentração dos organismos (Figura 7), conduzindo tal conjunto para observação das características taxonômicas e em seguida, com a utilização de bibliografia pertinente e o subsídio de chaves taxonômicas alcançar a identificação das espécies. O ideal é que sejam coletadas duas amostras para o desenvolvimento da análise qualitativa, sendo uma mantida em condições naturais, denominada amostra viva, e uma segunda fixada, seja com formol ou lugol.

I

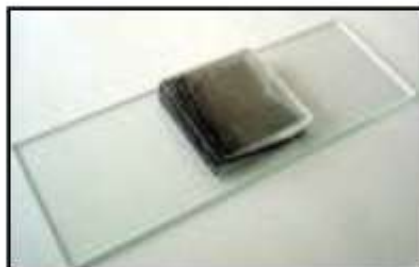


Figura 6. Conjunto lâmina laminula.

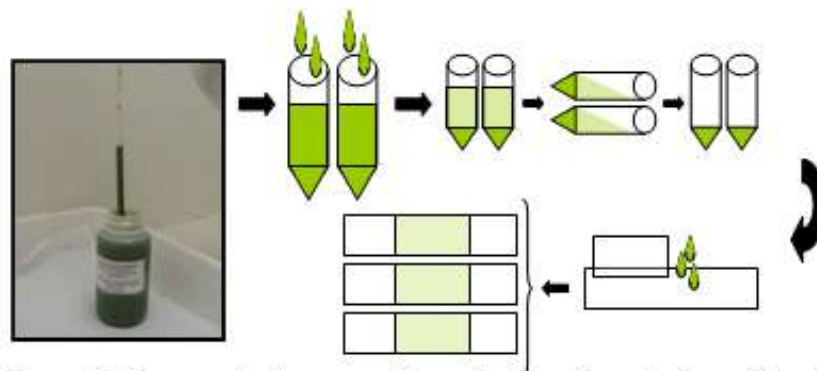
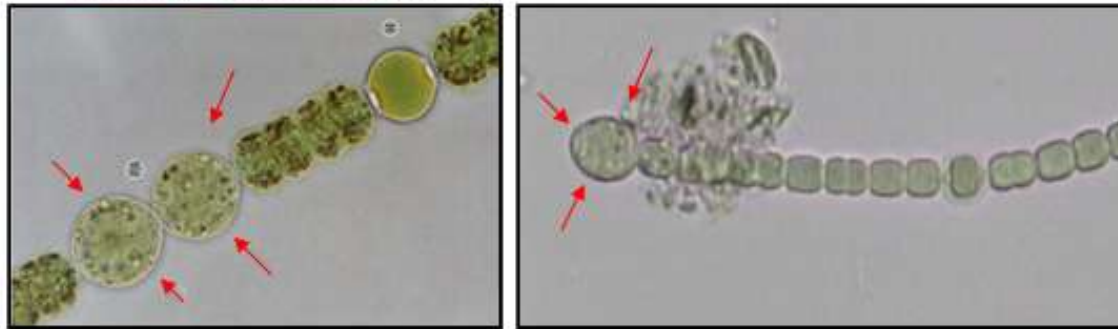


Figura 7. Representação esquemática do procedimento da análise de amostras para o estudo qualitativo de cianobactérias.

#### 4. Reconhecimento de algumas estruturas e termos para identificação de cianobactérias

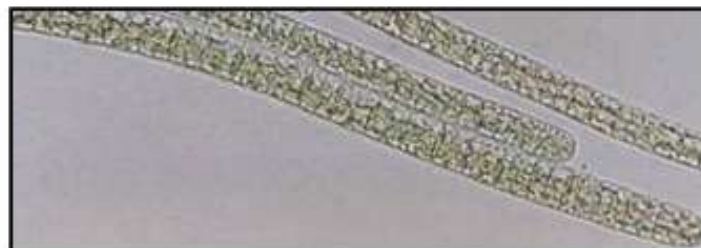
A análise qualitativa ou a identificação dos táxons requer do técnico que desenvolverá tal atividade, o reconhecimento do máximo de estruturas e termos relacionados às cianobactérias, o que possibilitará maior afinidade com o grupo em questão e conseqüentemente, maior agilidade e precisão ao diagnóstico:

**Acineto** - célula vegetativa diferenciada que aumenta de tamanho, com parede espessada e conteúdo celular densamente granulado, constituindo-se em esporo de resistência, sendo evidenciada apenas nas ordens Nostocales e stigonematales (Figura 8);



**Figura 8.** Acineto evidenciado pelas setas em vermelho: **A** - *Anabaena Planktonica*; **B** - *Anabaena* sp. Fotos dos arquivos do laboratório de microalgas da UFRPE.

**Aerótopos** - vesículas gasosas que permitem o controle da flutuabilidade, ou seja, auxiliam no deslocamento do táxon ao longo da coluna d'água, o que permite maior aproveitamento da luz e conseqüentemente aumento da atividade fotossintética (Figura 9);

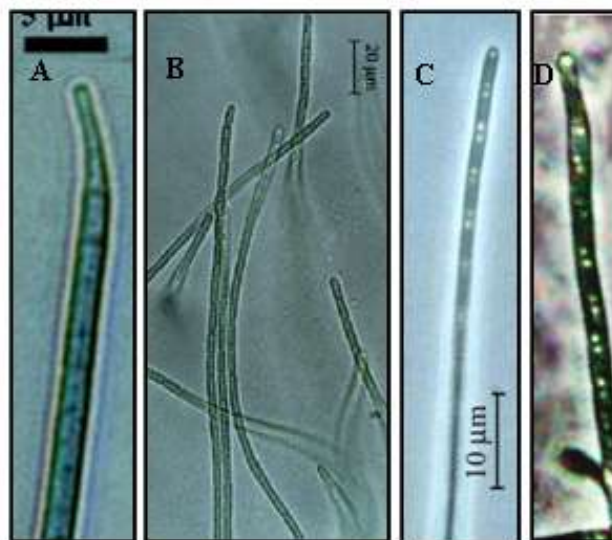


**Figura 9.** Filamentos de *Planktobryx mucuginis* com a presença evidente de aerótopos. Fotos dos arquivos do laboratório de microalgas da UFRPE.



### Geitlerinema e Limnothrix (Figura 16)

Algumas espécies dos gêneros *Geitlerinema* e *Limnothrix* podem ser facilmente confundidas, necessitando bastante atenção do pesquisador. Descrição de estruturas comuns: Ambos os gêneros podem ocorrer solitários ou emaranhados (feixes), não apresentam bainha, tricomas retos ou flexuosos, não constrictos ou levemente constrictos. Características de distinção: A diferenciação entre as espécies *G. splendidum* (Gomont) Anagnostidis, *G. amphibium* (Gomont) Anagnostidis, *G. unigranulatum* (Singh) Komárek & Azevedo e *Limnothrix planctonica* (Woloszynska) Meffert se dá principalmente quanto a motilidade e a presença de aerótopos, pois para o gênero *Limnothrix* não se observa movimento e há aerótopos, enquanto *Geitlerinema* apresenta motilidade intensa e não possui aerótopos, daí a importância em coletar amostras sem conservantes. *G. splendidum* apresenta célula apical bastante atenuada, curva e capitada; *G. amphibium* apresenta tricomas levemente constrictos, com células isodiamétricas ou mais longas que largas e 1 ou mais grânulos dispostos aleatoriamente; *G. unigranulatum* possui um (01) grânulo disposto em cada pólo celular ou septo, além de apresentar diâmetro celular menor (1,0µm - 1,8 µm) e *Limnothrix planctonica* célula apical cilíndrica com ápice arredondado e aerótopos localizados nos pólos e centro celular.



**Figura 16.** A - *G. splendidum*; B - *G. amphibium*; C - *G. unigranulatum*; D - *Limnothrix planctonica*. Fotos A e B retiradas do Atlas de Microalgas e Cianobactérias de Águas Continentais Brasileiras, elaborado pela seção de ficologia do Instituto de Botânica – IBT.

## Objetivo

DOCUMENTO TÉCNICO APRESENTANDO  
INFORMAÇÕES PARA O

Orientar e auxiliar a execução do diagnóstico quantitativo de cianobactérias, no que se refere ao cálculo do número de células destes organismos, para profissionais dos laboratórios das Unidades regionais de controle da qualidade da água – URCQAs/FUNASA, apresentando uma ferramenta de facilitação para o desenvolvimento da referida atividade.

## 1. UM BREVE HISTÓRICO SOBRE MICROSCÓPIOS

O primeiro protótipo de um microscópio data de 1590, criado por Hans Janssen e Zacharias Janssen, provavelmente movidos pela curiosidade em conhecer o mundo que os olhos não viam e que suas mentes imaginavam existir, constituíram uma combinação de lentes capaz de ampliar uma imagem até 30x o seu tamanho real. No século XVII, com o aperfeiçoamento das lentes e a capacidade de promover maior ampliação, o físico holandês Antonie Van Leeuwenhoek desenvolveu um microscópio simples que possibilitava ampliações de até 200x, permitindo-lhe realizar as primeiras observações microscópicas de materiais biológicos. Desde então, a microscopia permitiu grandes descobertas para ciência, como a realizada pelo inglês Robert Hooke em 1665, que na ocasião observou pela primeira vez pequenas estruturas vazias que lembravam minúsculas caixas ou compartimentos, as quais foram denominadas celas, dando origem ao que hoje conhecemos como células. Há algum tempo a microscopia já se encontra bastante diversificada e modernizada, sejam com relação aos equipamentos propriamente ditos ou com as técnicas de preparação de lâminas, atendendo às mais específicas necessidades da ciência na busca incessante pelo conhecimento, possibilitando, por exemplo, imagens de ultraestruturas através da microscopia eletrônica (Figura 01. A e B).

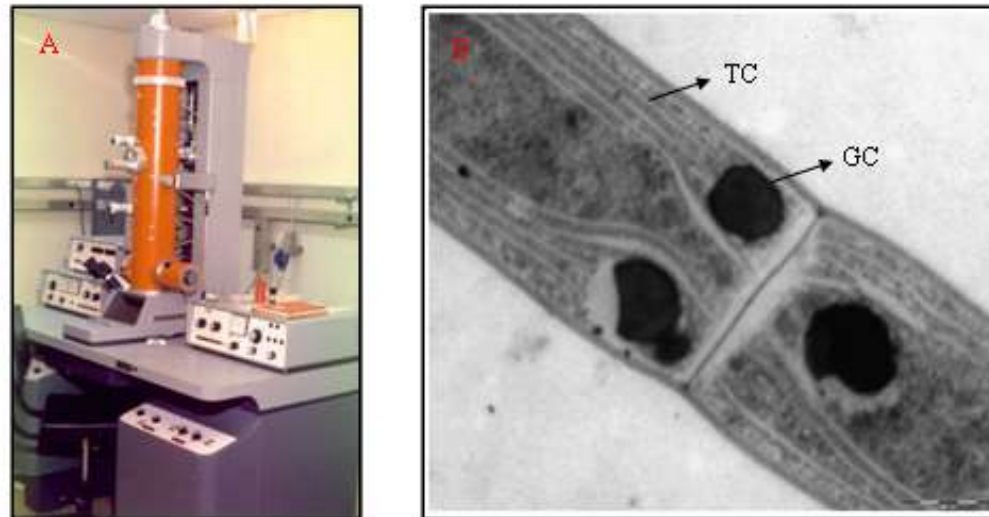


Figura 01. A - Vista parcial de um microscópio eletrônico (Fonte: <http://anatpat.unicamp.br/mustechiop/html>); B - Corte longitudinal de espécies de cianobactéria (*Geitlerinema amphibium*) evidenciando os feixes de tilacoides (TC) e os grânulos de cianoficina (GC) (Fonte: Laboratório de Microalgas da UFRPE).



### 1.2.1 Componentes mecânicos e ópticos de um microscópio básico para o estudo de cianobactérias:

1. **Base ou pé** - estrutura de sustentação do microscópio, a qual deve sempre estar apoiada a uma superfície plana e livre de trepidações;
2. **Coluna ou braço** - estrutura de ligação entre a base e os componentes de visualização do microscópio;
3. **Mesa ou platina (placa de platina)** - estrutura de acomodação da lâmina, geralmente apresenta espaço para passagem da luz e pinça ou alça de sustentação da lâmina;
4. **Charriot** - é uma estrutura ligada à platina e a pinça ou alça de sustentação da lâmina, movimentando tais peças horizontalmente, tanto para esquerda e direita como para frente e para trás;
5. **Revolver** - estrutura de sustentação das objetivas, onde estas são acopladas;
6. **Parafusos macrométrico e micrométrico** - são peças que quando acionadas aproximam a platina das objetivas, ou seja, quando a platina estiver com uma lâmina para observação, tais peças servirão para ajustar o foco da imagem: o parafuso macrométrico aproxima rapidamente, enquanto o micrométrico possibilita uma aproximação lenta ou fina;
7. **Diafragma** - é um conjunto de estruturas mecânicas de parafusos ou alavancas, as quais têm como função expandir tal foco;
8. **Condensador** - conjunto de lentes que orientam a luz luminosa sobre o campo de visão do microscópio;
9. **Lentes objetivas** - são os instrumentos de ampliação que proporcionam um aumento que varia de 10 (objetiva 10x) a 100 (objetiva 100x) vezes o tamanho real do objeto;
10. **Lentes oculares** - permitem a visualização e ampliação da imagem formada pelas lentes objetivas;
11. **Câmara clara** - permite que a visualização da imagem seja projetada dentro das dimensões observadas;
12. **Contraste de fase** - recurso óptico que proporciona maior nitidez ou destaque ao objeto observado.

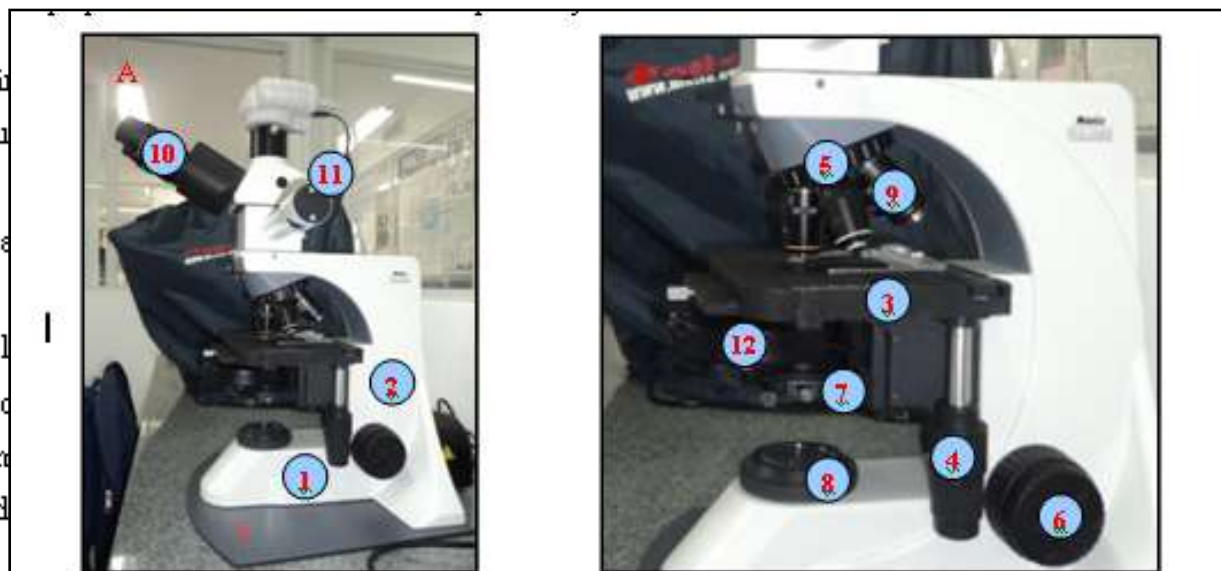


Figura 02. A e B - Microscópio óptico trinocular com detalhamento numerado dos componentes mecânicos e ópticos.

### 1.3 Microscópios utilizados no diagnóstico de cianobactérias

Para o diagnóstico de cianobactérias não é necessário microscópios tão avançados, um simples microscópio biológico já responderia de forma plena a todas as etapas da análise, estudo qualitativo e quantitativo, desde que, fosse utilizado método de contagem compatível ao equipamento em questão (Ex. câmara de Sedgewick Rafter). Sobretudo, como orientação para obtenção de resultados mais precisos, além do microscópio biológico, melhor adequado ao estudo qualitativo, recomenda-se o uso de microscópio invertido para quantificação das células através de câmaras ou cubetas de Utermöhl.

#### **A) Microscópio biológico binocular ou trinocular** (Figura 03)

O microscópio biológico binocular ou trinocular é um equipamento essencial para o diagnóstico de cianobactérias, podendo ser utilizado tanto para a análise qualitativa (sendo esta sua principal função) como para quantitativa, dependendo do método empregado. Toda a etapa relacionada à identificação das espécies (ou seja, análise qualitativa) depende de observações em microscópio biológico comum, sendo realizadas medições das células, desenhos esquemáticos das espécies e de suas estruturas morfológicas, além de anotações sobre outros aspectos morfofisiológicos essenciais para definição dos táxons. O microscópio biológico comum pode ser utilizado em análises quantitativas através do método com câmara de Sedwick Rafter, o qual é amplamente aceito e proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em sua publicação (Chorus e Bartram, 1999). Para aquisição de um microscópio com a especificação citada, no momento da compra, deve-se ter a atenção para solicitação de alguns acessórios indispensáveis: retículo micrométrico ou micrometrado para acoplar na ocular, retículo de Wippler para acoplar na ocular e lâmina micrométrica para calibração das objetivas. Outros acessórios podem ainda acrescentar muita qualidade as análises, como a câmara clara e sistemas de captura de imagens, sendo este último para microscópio biológico trinocular.



**Figura 03. Microscópio biológico trinocular com sistema de captura de imagem. Equipamento do laboratório de cianobactérias da URCQ/SUEST/FUNASA-PE.**



**Figura 04. Microscópio invertido trinocular. Equipamento do laboratório de cianobactérias da URCQ/SUEST/FUNASA-PE**

## 2. FERRAMENTAS E/OU ACESSÓRIOS UTILIZADOS DURANTE A ANÁLISE DE CIANOBACTÉRIAS

### A) Conjunto de câmara de Utermöhl (Figura 05)

A câmara ou cubeta de Utermöhl consiste em um conjunto com base e torre, que pode ser fixa ou móvel, dependendo da capacidade de sedimentação, e apresenta diferentes volumes (Ex. 2,0; 3,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100mL). O método de Utermöhl (1958) baseia-se na sedimentação da amostra em um volume predeterminado, onde a contagem das células de cianobactérias (ou de qualquer grupo fitoplanctônico) ocorre a partir de observações em campos aleatórios ou transectos, em um microscópio invertido, e sua densidade pode ser calculada considerando o volume sedimentado, a área cortada (área do campo de observação da objetiva x n° de campos analisados), a área do fundo da câmara e o número de células quantificadas (CETESB. 2005).



Figura 05. Conjuntos de câmaras de Utermöhl com diferentes volumes.



Figura 06. Câmara de sedgewick Rafter.

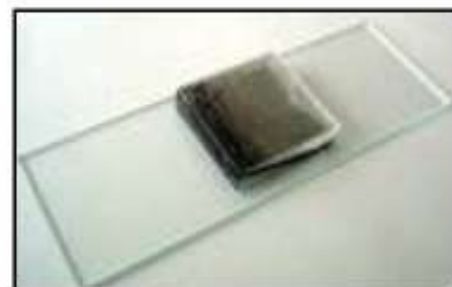


Figura 07. Conjunto de lâmina e lamínula.



Figura 08. Pipeta graduada utilizada durante transferência de amostra para cubeta de Utermöhl.



### 3. FERRAMENTAS E/OU ACESSÓRIOS DE UM MICROSCÓPIO QUE NECESSITAM DE CALIBRAÇÃO

Como citado na apresentação deste manual, para o diagnóstico de cianobactérias é necessário constituir conhecimento sobre a calibração de alguns acessórios ou ferramentas de um microscópio, imprescindíveis para execução de todas as etapas da análise: identificação (qualitativo), quantificação e cálculo do número de células ( $Cél.mL^{-1}$ ). Para calibração de tais componentes faz-se uso de instrumentos de medição, sendo para o microscópio, a lâmina micrométrica ou micrometrada, e para as cubetas de Utermöhl, paquímetro profissional.

#### 3.1 Instrumentos de Medição utilizados para calibração

##### A) Lâmina micrométrica

Lâmina para calibração de microscópios, de dimensão semelhante a uma lâmina padrão de análise, apresenta régua microscópica gravada na porção central (Figura 09), reta ou em forma de cruz, com dimensão de um milímetro que, por sua vez, encontra-se subdividida em 1/100mm, entre as quais ajusta-se  $10\mu m$  (dez micrômetros) (Figuras 10) utilizada para o cálculo da área do campo de observação das lentes objet Wippler e do fator de conversão para o retículo micrométrico acoplado à lente

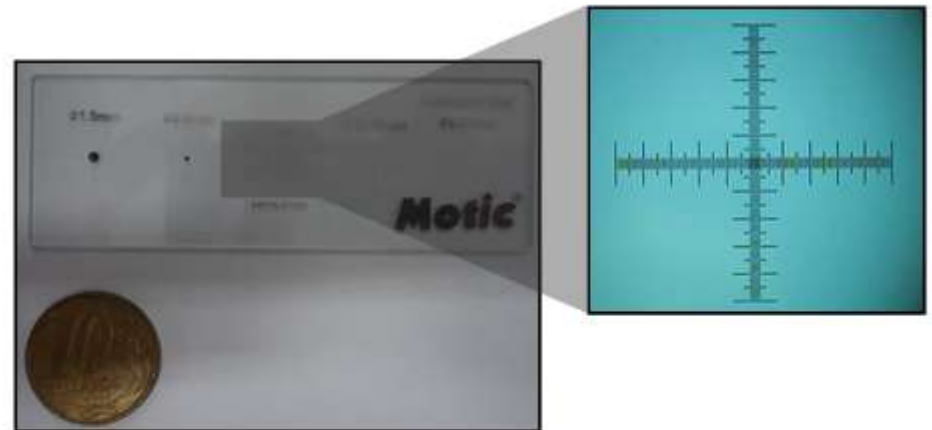


Figura 09. Representação de uma lâmina micrométrica com destaque da régua micrométrica em cruz.



Figura 10. Desenho da lâmina de calibração com detalhamento da régua micrométrica (linear) e valor em micrômetros ( $m$ ) entre cada fração.

### 3.2 Ferramentas e/ou acessórios para calibração

#### A) Retículo micrométrico

Consiste em um tipo de “película” ou pequena placa de vidro circular, podendo ainda ser constituída por acrílico, que apresenta uma escala reta (Figura 12) ou às vezes em forma de cruz, que mede geralmente 10 mm (1cm) subdivididos em 100 partes, ajustada para ser acoplada em uma das oculares do

22

microscópio. O retículo é utilizado para aferir as estruturas morfológicas, tais como as dimensões de comprimento e largura das células, informações úteis para a identificação dos táxons.

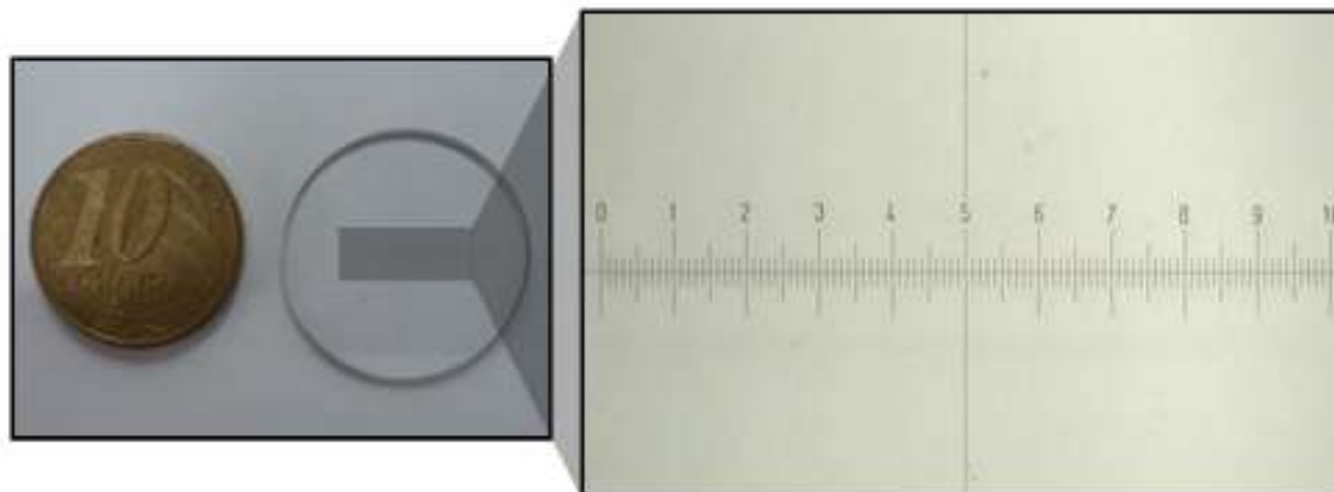


Figura 12. Desenho do retículo micrométrico com detalhe da escala em linha reta.

#### 4. PROCEDIMENTOS DE CALIBRAÇÃO E KIT TEORICO-PRATICO

Para melhor entendimento dos procedimentos de calibração dos retículos das oculares e área das objetivas foi elaborado um “kit teórico-prático”, composto pelas representações gráficas dos seguintes componentes: Lâmina micrométrica (LM); Retículo micrométrico (RM); Retículo de Wippler (RW); e Area da objetiva (AO) (Figura 14 A - D). As referidas representações foram ampliadas a partir das imagens reais dos componentes citados e impressas em folha de transparência (Anexo - A), de forma que os procedimentos de calibração possam ser representados manualmente, conforme as descrições a seguir.

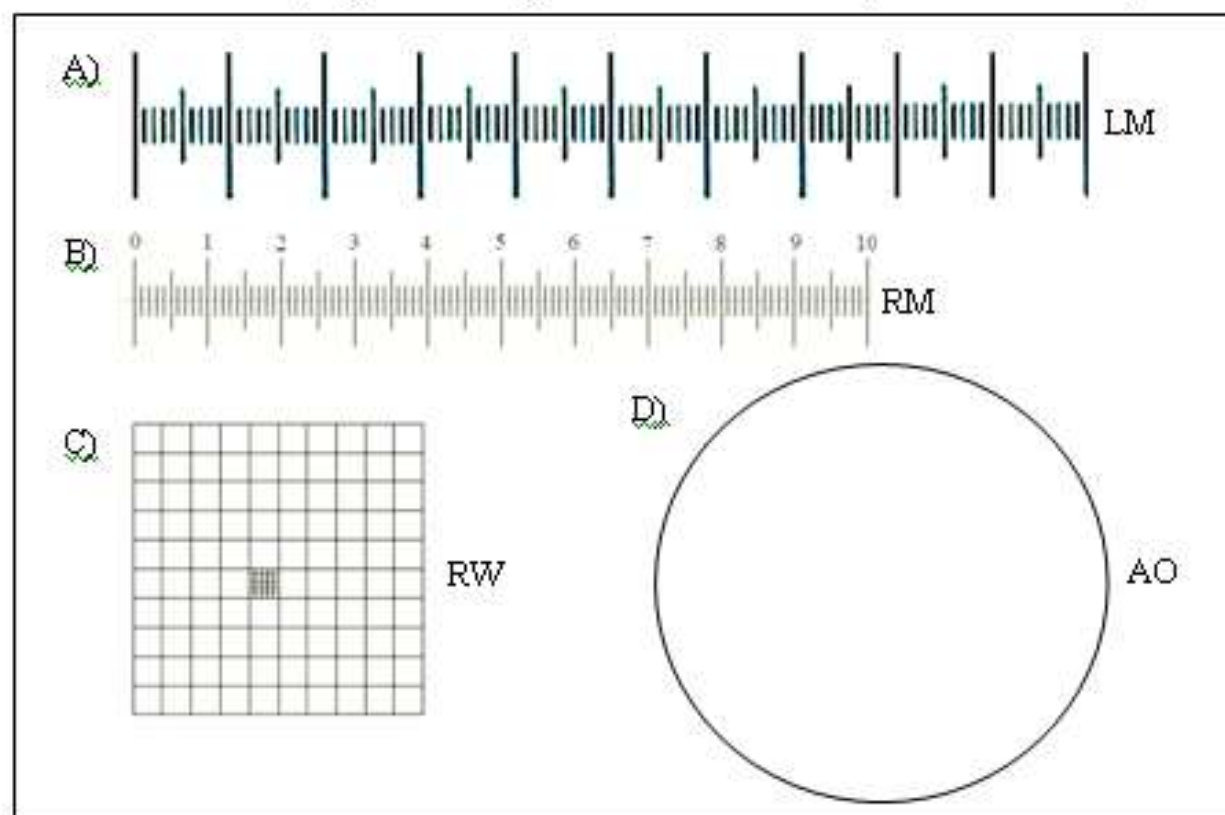


Figura 14. Representações gráficas: A) Lâmina micrométrica (LM); B) Retículo micrométrico (RM); C) Retículo de Wippler (RW); e D) Area da objetiva (AO).



## 4.1 Calibração de retículos

### 4.1.1 Retículo de Wippler - RW

a) A Calibração do retículo de Wippler consiste no cálculo da área, sendo para tal procedimento utilizado, além do componente em questão, a lâmina micrométrica. O cálculo da área do retículo deve ser realizado para cada lente objetiva.

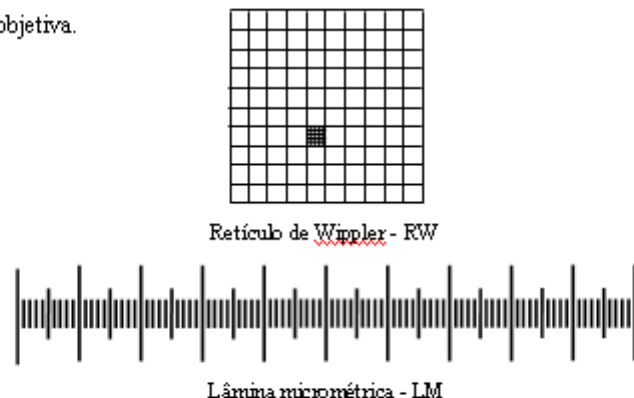


Figura 15. Componentes para calibração do retículo de Wippler.

b) Sobrepor a primeira linha vertical esquerda do retículo de Wippler - RW, sobre a marca da origem esquerda da lâmina micrométrica - LM;



Figura 16. Sobreposição do retículo de Wippler sobre a lâmina micrométrica.

c) Contar quantas frações ou unidades da lâmina micrométrica encontram-se inseridas entre a primeira e a última linha vertical do retículo de Wippler - RW;

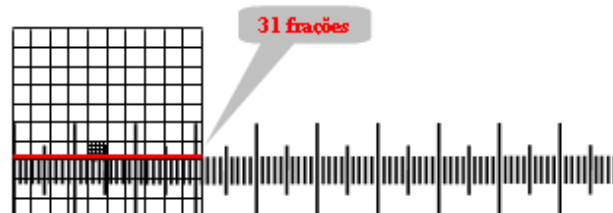


Figura 17. Quantificação do número de frações da lâmina micrométrica sobre um dos lados do RW.

d) Tendo o conhecimento prévio descrito no item 3.1 do presente manual, sabe-se que o tamanho entre as frações ou unidades da lâmina micrométrica - LM equivale a  $10\mu\text{m}$ , logo, para o próximo passo deve-se multiplicar as unidades contadas por 10 (dez);

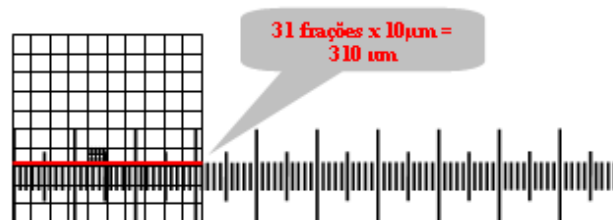


Figura 18. Transformação do número de frações quantificadas da lâmina micrométrica em  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2 Retículo micrométrico - RM

a) Para o cálculo de conversão das frações ou unidades do retículo micrométrico - RM da ocular em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ), deve-se utilizar a lâmina micrométrica - LM. Para melhor percepção do procedimento de conversão foi adotado coloração diferenciada para o retículo. O cálculo de conversão deve ser realizado para cada lente objetiva.

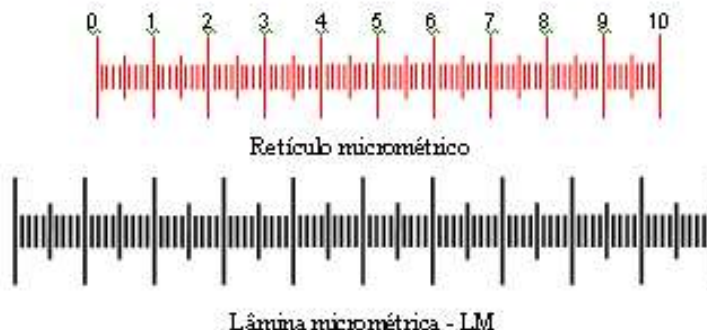


Figura 20. Componentes para calibração do retículo micrométrico.

b) Sobrepor a marca de origem esquerda do retículo micrométrico - RM sobre a marca de origem esquerda da lâmina micrométrica - LM e identificar a primeira coincidência entre as frações das duas escalas, após 50% do retículo micrométrico;

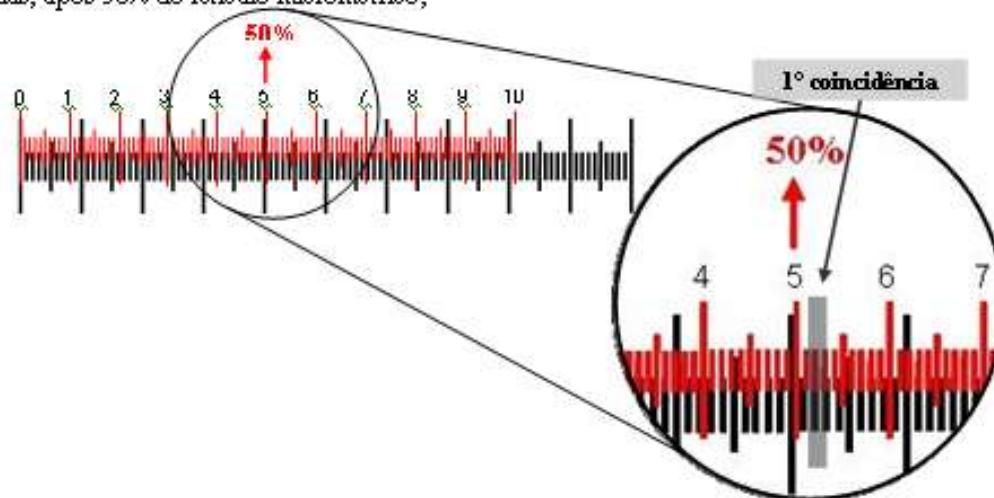


Figura 21. Demonstração da sobreposição e do ponto de coincidência entre RM e LM.

### 4.3 Calibração das cubetas

Com relação à calibração das cubetas de Utermöhl, deve-se ter o conhecimento do valor da área do fundo

do referido instrumento de análise, uma vez que tal dado ou valor será incorporado ao número de células de cianobactérias. Além da área de fundo, o volume sedimentado na cubeta utilizado no respectivo cálculo de células, no entanto tal valor já deve ser previamente considerado que as cubetas precisam ser solicitadas no ato de compra com os seus respectivos certificados de calibração. Caso o certificado não exista ou para conferência dos valores apresentados nos certificados, deve-se calcular o volume da cubeta, conforme a demonstração do procedimento

#### 4.3.1 Calibração da área do fundo da cubeta

a) Para o procedimento do cálculo da área do fundo da câmara ou cubeta de Utermöhl, use em suas mãos um paquímetro profissional;



Figura 29. Paquímetro profissional e base da câmara ou cubeta de Utermöhl.

b) Com um paquímetro em mãos, ajuste o componente do instrumento relacionado à aferição de medidas internas, ao diâmetro interno da cubeta de Utermöhl.



Figura 30. Demonstração do ajuste do paquímetro sobre a porção interna da cubeta de Utermöhl.

c) Após a aferição deve-se aplicar o valor obtido na fórmula de área de uma circunferência ( $A = \pi R^2$ ). Os cálculos efetuados para as cubetas de Utermöhl podem ser aproveitados entre instrumentos da mesma marca, no contrário recomenda-se nova aferição, uma vez que dependendo do fabricante as dimensões podem não ser as mesmas.

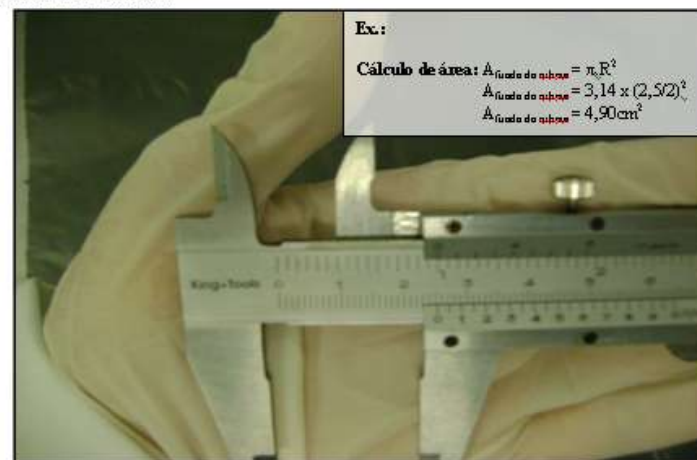


Figura 31. Detalhe da régua de aferição do paquímetro, apresentando 2,5cm de medida para o diâmetro interno da cubeta de Utermöhl, e respectivo cálculo da área.

## 5. Aplicação dos cálculos de densidade de cianobactérias

Com todos os dados necessários para aplicação do cálculo de densidade das cianobactérias devidamente apresentados, vamos conhecer como aplicá-los para determinação da densidade de células de cianobactérias. Nesse sentido, será apresentada a fórmula descrita na Norma Técnica - CETESB/L5. 303 (2005), que consiste inicialmente na determinação do Fator "F", através da fórmula,  $F = A/a/v$ , onde: **F** - consiste no fator de multiplicação do número de células contadas na amostra analisada; **A** - corresponde ao valor da área do fundo da cubeta; **a** - é o valor da área do campo da objetiva utilizada durante a contagem, ou seja, é a área da objetiva multiplicada pelo número de campos contados; e **v** - condiz ao volume inicial da amostra que foi sedimentado na cubeta de Utermöhl. O cálculo para determinação do Fator "F" pode ser aplicado para o estudo de todos os grupos fitoplanctônicos.

### Fórmula para determinação da densidade de células de cianobactérias: $F = A/a/v$

#### Onde:

**A** = área da cubeta;

**a** = área contada (área da objetiva x n° de campos conta

**v** = volume sedimentado.

#### 5.1 Exemplo da aplicação da fórmula

Considerando que durante uma análise quantitativa foram contadas 500 células de cianobactérias da amostra, em uma cubeta com volume de 10mL, utilizando uma objetiva com aumento de 40X, onde foram analisados um total de 20 campos da objetiva (considerar  $A = 4,9 \text{ cm}^2$  e área do campo da objetiva =  $0,002 \text{ cm}^2$ )

#### Organizando os dados

**A** - área do fundo da cubeta = **4,9cm<sup>2</sup>**;

Área do campo da objetiva de 40X = 0,002;

Número de campos analisados = 20;

**a** - Área contada = **0,04cm<sup>2</sup> (20 x 0,002)**;

**v** - Volume sedimentado = 10mL;

#### Cálculo

**F(fator) =  $V/a/v$**

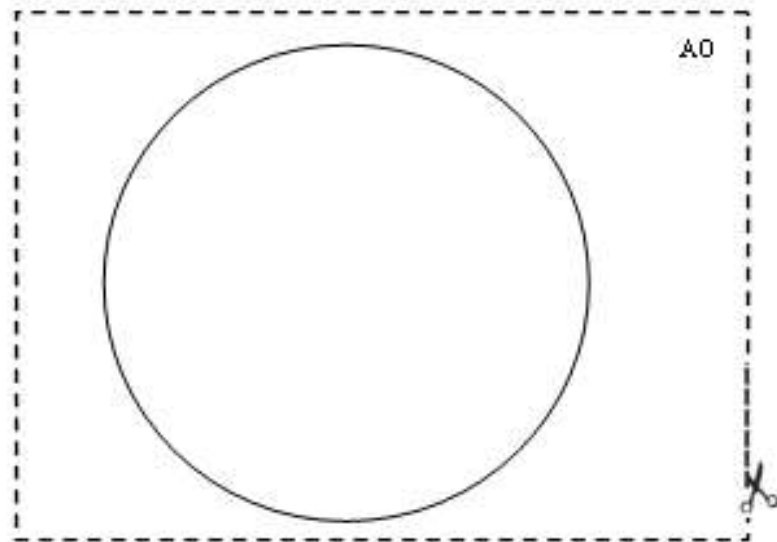
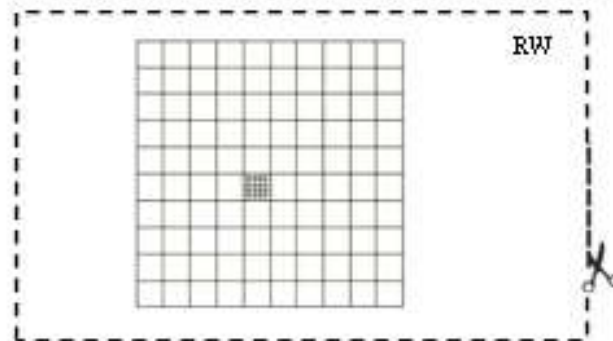
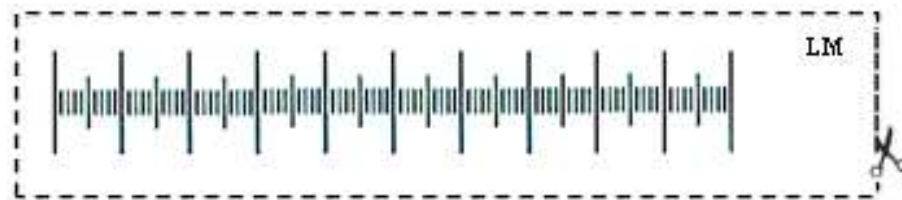
**F(fator) =  $4,9/0,04/10$**

**F(fator) = 12,5**;

**Obs.:** Com o cálculo do fator em mãos deve-se multiplicar o valor de **F** pelo número de células contadas durante a análise: Número de células = **F x 500** →  $12,5 \times 500 = 6.259$

Logo, o número de células de cianobactérias por mL será igual a 6.259 cél./mL.





# Resultados das ações desenvolvidas

**URCQA/PE – referência para os demais laboratórios da Funasa;**

**URCQAs dos estados de MG, RJ, ES, PB, entre outros, encontram-se equipadas e algumas destas já realizam análises de cianobactérias;**

**Os guias apresentados serão reunidos em um único manual da Funasa;**

# **Ações que ainda podem ser desenvolvidas**

- **Iniciativas voltadas à educação ambiental no controle da poluição dos mananciais;**
- **Implantação do diagnóstico de cianotoxinas na URCQA/PE;**
- **Realização de novos cursos de capacitação no diagnóstico de cianobactérias e também, no de cianotoxinas.**

**Giulliarì Lira**

Biólogo-CRBio 46.028/5D

Consultor científico

giulliarì@gmail.com