

Rotina para quantificação rápida da densidade da cianobactéria *Planktolyngbya contorta* através de método de fluxo contínuo (*FlowCAM*)

Isadora Menegon¹, David da Motta Marques²

¹Graduanda em Engenharia Hídrica - UFRGS, isamenegon@hotmail.com; ²Docente do Programa de Graduação e Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH/UFRGS)

INTRODUÇÃO

A avaliação da composição e densidade de cianobactérias em ambientes aquáticos é importante para o monitoramento da qualidade da água, pois estes microorganismos possuem amplas estratégias adaptativas, potencial desenvolvimento de florações e produção de cianotoxinas, que podem causar desequilíbrio a esses ecossistemas. Para a obtenção de dados relacionados ao fitoplâncton, do qual as cianobactérias fazem parte, são utilizadas técnicas microscópicas que demandam estudos altamente especializados e elevado tempo para a obtenção de resultados. Recentemente, técnicas automatizadas para a determinação da densidade algácea começaram a ser utilizadas. Uma destas técnicas é um equipamento de fluxo contínuo, denominado *FlowCAM*, que determina instantaneamente o número, tamanho e forma das partículas microscópicas orgânicas de uma amostra ambiental.

OBJETIVO

Desenvolver uma rotina para quantificação rápida da espécie de cianobactéria *Planktolyngbya contorta*, através do *FlowCAM*, comparando essa quantificação com a do método de microscopia tradicionalmente utilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras mensais coletadas na sub-superfície da água ao longo do ano de 2013, na zona pelágica da lagoa Mangureira, RS. A lagoa Mangureira é uma grande lagoa costeira situada no sul do Rio Grande do Sul, Brasil, que possui uma profundidade média de 2,6 m, com 90 km de comprimento e 3-10 km de largura (Fig. 1). As amostras foram fixadas com solução aquosa de formalina a 3-5%. Para a quantificação da densidade da *P. contorta* pelo método tradicional (Utermöhl – 1958), foram colocados 2 ml de cada amostra em câmaras de sedimentação, com tempo de sedimentação de 2 horas, sendo a contagem realizada com auxílio de microscópio invertido (Fig. 2). Já as alíquotas amostrais de 2 ml quantificadas pelo *FlowCAM* (Version 3.2, May 2012; VisualSpreadsheet@ 3.4, Portable; Fig. 3) passaram por uma célula de fluxo, onde são identificadas automaticamente pelo equipamento. Após essa identificação, foram criados e testados filtros que fazem com que o software do equipamento identifique somente a espécie pretendida, no caso, *P. contorta*, como medidas de tamanho, compacidade, circularidade, alongamento, dentre outros. Para testar diferenças significativas entre os métodos tradicional e *FlowCAM* foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney, e para diferenças entre os métodos e os meses amostrados foi utilizado o teste estatístico multivariado MANOVA. Para análise dos resultados encontrados através do *FlowCAM* foi realizado o seguinte roteiro (Fig. 4):

1) Cada amostra foi quantificada pelo *FlowCAM* e forneceu um banco de imagens com dados brutos, ou seja, além da *P. contorta* foram identificadas outras espécies de algas

Densidade algácea total da amostra identificada através do *FlowCAM*

2) Foi adicionado um filtro criado para a identificação da *P. contorta* pelo *FlowCAM*

Determinação da densidade de *P. contorta* usando o filtro selecionado

3) Seleção manual dos indivíduos de *P. contorta* tanto na amostra com o filtro quanto na amostra sem o filtro

Densidade de *P. contorta* alcançada manualmente, após utilização do filtro

Densidade de *P. contorta* alcançada manualmente sem a utilização do filtro

Fig. 4: Roteiro esquemático para demonstrar a análise dos resultados encontrados através do *FlowCAM*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvares E, Moyano M, Lopez-Urrutia A, Nogueira E, Scharek R. 2014. Routine determination of plankton community composition and size structure: a comparison between *FlowCAM* and light microscopy. *J. Plankton Res.* 36(1): 170–184.
- Dashkova V, Malashenkov D, Poulton N, Vorobjev I, Barteneva N. 2016. Imaging flow cytometry for phytoplankton analysis. *FlowCAM® Manual*. Version 3.4, May 2013.
- Matiello I. 2014. Avaliação de corantes para a detecção e viabilidade do fitoplâncton marinho. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Lund JWG, Kipling C, LeCren ED. 1958. The invert microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*. 11:143-170.
- Utermöhl H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton. *Method Mitt Int Ver Limnol.* 9: 1–38.
- Wang C, Wu X, Tian C, Li Q, Tian Y, Feng B, Xiao B. 2015. A quantitative protocol for rapid analysis of cell density and size distribution of pelagic and benthic *Microcystis* colonies by *FlowCAM*. *J Appl Phycol.* 27: 711–720.

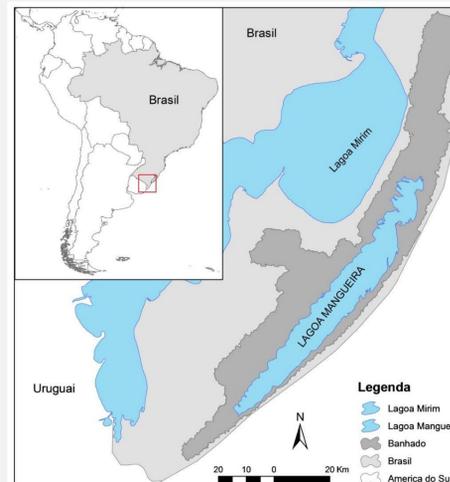


Fig. 1. Lagoa Mangureira, RS, Sistema Hidrológico do Taim (SHT).



Fig. 2. Microscópio invertido e câmaras de sedimentação de 2 ml, 5 ml e 10 ml, respectivamente. Fig. 3. Equipamento automático de fluxo contínuo, *FlowCAM*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observadas diferenças significativas entre os métodos tradicional e *FlowCAM* ($P = 0,002$). Foram observadas, também, diferenças significativas entre o *FlowCAM* e os meses amostrados ($P = 0,01$). Não foram observadas diferenças significativas entre os meses e os demais métodos ($P > 0,05$) (Tradicional, *FlowCAM* manual com filtro e *FlowCAM* manual sem filtro). Nos meses de maio e novembro não foram encontrados indivíduos pertencente a espécie estudada pelo *FlowCAM*.

Foi necessário criar um filtro específico para cada mês, conforme observado na tabela 1. Até o momento, os melhores resultados foram obtidos, utilizando-se os filtros: diâmetro e simetria, que não foram selecionados apenas para a identificação da espécie no mês de janeiro/2013.

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

Tabela 1. Filtros utilizados na identificação da *P. contorta* pelo *FlowCAM* para cada um dos meses amostrados ao longo do ano de 2013 na Lagoa Mangureira, RS. Legenda: Ch2/Ch1: divisão entre o valor máximo de fluorescência de duas medições.

Como se pode observar, ainda não foi possível criar um filtro padrão para identificação da *P. contorta* pelo *FlowCAM* e, com isso, finalizar a rotina de identificação rápida, confiável e eficiente dessa espécie para a Lagoa Mangureira.

Diferente do resultado encontrado neste estudo, o *FlowCAM* já mostrou excelente precisão em estimativas de abundância, espectros de tamanho e densidade da comunidade fitoplanctônica quando comparados com os resultados obtidos por análise microscópica tradicional das mesmas amostras (Álvares et al. 2014; Wang et al. 2015).

No entanto, a maioria dos estudos realizados foram utilizadas amostras vivas e retiradas de cultivos unialgais (Dashkova et al. 2016). Além disso, corantes, como vermelho neutro, azul de Evans, azul de tripan e SYTOX Green já foram utilizados para uma melhor identificação dos indivíduos (Matiello et al. 2014).

CONCLUSÃO

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

AGRADECIMENTOS

PIBIC CNPq-UFRGS – Processo 135224/2017-9
Laboratório de Ecotecnologia e Limnologia – IPH - UFRGS
Lúcia Ribeiro Rodrigues, docente do IPH-UFRGS e Juliana Elisa Bohnenberger, doutoranda do IPH-UFRGS pelas valiosas contribuições neste trabalho.