

Preparação de amostras para exame de protozoários e flagelados de água doce

ELENITA GHERARDI GOLDSTEIN (*)
REGINA LÚCIA DE LIMA LOPES (*)
DENISE NAVAS PEREIRA (*)

1. INTRODUÇÃO

Na realização de exames de amostras de fitoplâncton em que ocorre grande porcentagem de protozoários e flagelados, um dos problemas com que o biólogo se defronta é a necessidade de conseguir, para contagem e identificação, a imobilização dos organismos através de fixadores, sem contudo haver alteração de sua morfologia e estrutura interna, a fim de se poder identificá-los e minimizar erros na avaliação.

Alguns reagentes recomendados para retardar o movimento de protozoários ciliados são: solução de metil celulose a 10% (Marsland, 1943, in: Vollenweider, 1974), solução de sulfato de níquel (Tartar, 1950, in: Vollenweider, 1974), ou solução de lugol (Kudo, 1966; Vollenweider, 1974), sendo que a última muitas vezes altera a estrutura dos organismos.

Segundo o "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater" (APHA, 1975), as substâncias mais utilizadas atualmente para fixação, conservação, imobilização e contagem de fitoflagelados e leucoflagelados são: formaldeído neutralizado a 4%, mertiolato na concentração de 3,6% e solução de lugol a

1%. Outra substância largamente utilizada em exames biológicos é o álcool etílico 70% (APHA, 1975); o detergente, utilizado na concentração de amostras de plâncton (Weber, 1973), também pode servir para as finalidades propostas.

No entanto, as concentrações utilizadas para o exame variam de uma amostra para outra, sendo escassa a bibliografia a esse respeito.

Visando determinar a concentração mínima necessária de cada uma das substâncias acima discriminadas, foi elaborado o presente trabalho, tentando verificar a concentração de lugol, formaldeído, mertiolato diluído a 50%, álcool 70% e detergente, que melhor atenderiam aos atuais objetivos, e qual ou quais dessas substâncias seriam mais indicadas para a realização do exame imediato de fitoflagelados, leucoflagelados e outros protozoários de água doce.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS E REAGENTES

Para testes referentes a protozoários e flagelados em geral, foram utilizadas amostras provenientes de lagoas de estabilização e de chorume, assim como cultura de leucoflagelados do gênero *Chilomonas*, desenvolvidas no laboratório.

Os organismos presentes nas amostras foram testados em várias concentrações de: lugol, álcool 70%,

solução de mertiolato, detergente doméstico comumente encontrado em supermercados (ODD) e formol neutralizado a 4%.

2.1.1. Preparação da solução de mertiolato

Esta solução é preparada a partir das seguintes soluções:

— solução A: Dissolver 1 g de mertiolato (sódio etil mercúrio tiosalicilatotimerosal) em 300 ml de água destilada.

— solução B: Dissolver 1,5 g de bórax (borato de sódio) em 300 ml de água destilada.

— solução C: Dissolver 40 g de iodo e 60 g de iodeto de potássio em 1 litro de água destilada. Tomar 1 ml desta solução e diluir em 300 ml de água destilada.

Combinar as 3 soluções e elevar o volume a 1 litro.

Esta solução, diluída a 50% (1 parte de água: 1 parte de solução de mertiolato), foi a utilizada nos testes deste trabalho.

2.1.2. Preparação da solução de formaldeído 4%

Neutralizar 1 litro de formol comercial com 5 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃).

A solução neutralizada é diluída a 10% (1 parte de formol: 9 partes de água) obtendo-se a solução de formaldeído a 4%.

(*) Biologistas da Superintendência de Estudos Ambientais da Diretoria de Tecnologia e Desenvolvimento — CETESB.

2.1.3. Preparação da solução de lugol

Dissolver 10 g de iodo puro, 20 g de iodeto de potássio e 20 g de ácido acético glacial em 200 ml de água destilada. Esta solução deve ser armazenada em frascos escuros. Não se deve utilizar solução de lugol preparada há muito tempo.

2.1.4. Preparação de álcool etílico 70%

Acrescentar água ao álcool etílico, medindo-se a concentração com um alcoômetro até atingir 70% (aproximadamente 7 partes de álcool: 3 partes de água).

2.1.5. Preparação da solução de detergentes (ODD) diluído a 10%

Dissolver 10 ml de detergente em 100 ml de água destilada.

2.2. EXAME DAS AMOSTRAS

As amostras foram observadas em lâmina e laminula comuns e em câmaras de Sedgwick-Rafter, com auxílio de microscópio binocular comum. Após 2 minutos de exposição ao fixador, verificou-se o aspecto morfológico dos organismos, suas alterações e mobilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise da Tabela I, verifica-se que em concentrações abaixo de 1,7% (inclusive) de mertiolato 50%, não houve imobilização de organismos de lagoas de estabilização e chorume, o mesmo ocorrendo com leucoflagelados mais delicados como *Chilomonas* sp. Os protozoários somente são imobilizados, sem apresentar alteração de sua estrutura interna, na concentração de 2,5%, concentração esta prejudicial a *Chilomonas* sp.

Pela Tabela II, nota-se que uma concentração de 0,24% de formaldeído neutralizado a 4% imobiliza e não altera a estrutura de todos os organismos observados, quer sejam procedentes de chorume ou cultura e quer sejam protozoários ou flagelados.

Quanto ao álcool etílico 70%, demonstra-se, através da Tabela III, uma variação maior quanto à concentração ideal para os diferentes organismos testados. Assim, uma concentração de 11,2% produz efeito satisfatório em culturas de *Chilomonas* sp, enquanto que leucoflagelados, fitoflagelados e protozoários de chorume somente são afetados na concentração de 16%.

A solução de lugol mostra-se eficiente na concentração de 0,096%

para *Chilomonas* sp, e na concentração de 0,20% para fitoflagelados, leucoflagelados e protozoários de chorume (Tabela IV).

Observando-se a Tabela V, verifica-se que uma concentração muito baixa (0,112%) de detergente diluído a 10% imobiliza *Chilomonas* sp, e 0,24% e 0,32% da mesma solução tornam imóveis, respectivamente, flagelados e protozoários de chorume.

Quanto às alterações produzidas na morfologia e estrutura interna dos organismos:

— a solução de detergente altera facilmente os organismos, chegando a desintegrá-los, mesmo nas baixas concentrações testadas, não se mostrando portanto eficiente para esse tipo de exame;

— a solução de mertiolato a 50% apresenta alterações na estrutura interna de leuco e fitoflagelados menos resistentes, quando se torna bom fixador para protozoários, o que dificulta sua utilização;

— com relação ao álcool 70%, os organismos apresentam variação fisiológica e morfológica muito diversa, o que significa que uma concentração dessa substância poderia ser eficaz para exame de determinada amostra e não para outra, ainda mais se aqui for lembrado que facilmente ocorre desintegração dos organismos;

— a solução de lugol é o fixador que atua melhor nas concentrações mais baixas (0,096%) e que praticamente não causa danos aos protozoários e flagelados na concentração de 0,20%, apresentando a vantagem de corá-los e tornar mais visíveis cistos e flagelos;

— outro fixador que se mostra eficaz em baixas concentrações, sem alterar morfológicamente os organismos considerados é a solução de formol neutralizado a 4%, a uma concentração de 0,24%, na qual todos os organismos são mantidos íntegros e imobilizados.

4. CONCLUSÕES

4.1. Os fixadores que menor alteração causam aos organismos testados são o lugol e o formol neutralizado a 4%, respectivamente em concentrações de 0,20% e 0,24%.

4.2. As soluções de detergente (ODD), álcool etílico 70% e mertiolato alteram com grande rapidez a estrutura dos organismos, dificultando a contagem e identificação dos mesmos, não sendo portanto recomendadas para exame de flagelados e protozoários de água doce.

BIBLIOGRAFIA

1. American Public Health Association — Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 14 ed. N.Y. APHA, AWWA, WPCF, 1975.
2. Bourrely, P. Les algues d'eau douce. Tome I, Tome II, Tome III, Edition N. Boubee e Cie., Paris, 1966, 1968.
3. Edmondson, T. Fresh Water Biology — 2nd. ed. John Wiley and Sons Inc., N.Y., 1959.
4. Kudo, Richard R. — Protozoology — 5th ed., Charles Thomas Publisher, Springfield, Illinois (USA), 1966.
5. Vollenweider, R.A. — A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments. IBP Hand Book n.º 12, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, London, 1974.
6. Weber, C.I. — Biological Field and Laboratory Methods for Measuring the Quality of Surface Waters and Effluents. U.S., EPA, Program Element IBA 027, 1973.

EFEITO DOS DIVERSOS FIXADORES NOS ORGANISMOS TESTADOS

Legenda:

- + Móveis
- + - Alguns em movimento
- Imóveis inalterados
- - Imóveis alterados
- × Teste não efetuado

TABELA I
Efeito de mertiolato 50% em flagelados, outros protozoários e *Chilomonas* sp

Organismos Concen- trações (%)	Protozoários	FLAGELADOS		<i>Chilomonas</i> sp
		Fito- flagelados	Leuco- flagelados	
0,9	+	+	+	+
1,0	+	+	+	+
1,2	+	+	+	+
1,5	+	+	+	+
1,7	+	+	+	+
1,9	+	+	+	-
2,0	+	- +	- +	- -
2,2	+	-	-	- -
2,5	-	- -	- -	- -
3,0	- -	- -	- -	- -

TABELA II

Efeito de formaldeído neutralizado a 4% em flagelados, outros protozoários e *Chilomonas* sp

Organismos Concen- trações (%)	Protozoários	FLAGELADOS		<i>Chilomonas</i> sp
		Fito- flagelados	Leuco- flagelados	
0,08	×	×	×	+
0,016	+	+	+	+
0,24	-	-	-	+ -
0,32	×	×	×	-
0,40	- -	- -	- -	- -
0,48	×	×	×	- -
0,56	- -	- -	- -	- -

TABELA III

Efeito do álcool etílico 70% em flagelados, outros protozoários e *Chilomonas* sp

Organismos Concen- trações (%)	Protozoários	FLAGELADOS		<i>Chilomonas</i> sp
		Fito- flagelados	Leuco- flagelados	
4,8	+	+	+	+
5,6	+	+	+	+
6,4	+	+	+	+
8,0	×	×	×	+ -
9,6	×	×	×	+ -
11,2	×	×	×	-
12,8	+	+ -	+ -	×
16,0	-	-	-	×
17,6	- -	- -	- -	×

TABELA IV

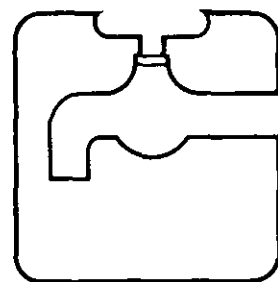
Efeito da solução de lugol em flagelados, outros protozoários e *Chilomonas* sp

Organismos Concen- trações (%)	Protozoários	FLAGELADOS		<i>Chilomonas</i> sp
		Fito- flagelados	Leuco- flagelados	
0,032	+	+	+	+
0,064	+	+	+	+ -
0,080	×	×	×	+ -
0,096	+	+	+	-
0,128	+	-	-	- -
0,160	+	-	-	×
0,200	-	-	-	×
0,250	-	- -	- -	×
0,380	- -	- -	- -	×

TABELA V

Efeito de detergente (ODD) diluído 1/10 em flagelados, outros protozoários e *Chilomonas* sp

Organismos Concen- trações (%)	Protozoários	FLAGELADOS		<i>Chilomonas</i> sp
		Fito- flagelados	Leuco- flagelados	
0,080	+	+	+	+
0,112	×	×	×	-
0,160	+	+	+	- -
0,240	+	-	-	×
0,320	-	- -	- -	- -
0,480	- -	- -	- -	×
0,560	- -	- -	- -	×



noticiário sabesp

MAIS 48 KM DE REDES COLETORAS DE ESGOTOS PARA SÃO PAULO

A Sabesp, empresa vinculada à SOMA — Secretaria de Obras e do Meio Ambiente, acaba de entregar mais 48 quilômetros de redes coletoras de esgoto na região norte da Capital, beneficiando, de imediato, 8.500 habitantes de 90 ruas de Vila Mangalot, Parque São Domingos, Parque Anhanguera e Vila Jaguará. As obras possibilitarão 4.800 ligações domiciliares, das quais 1.679 já foram feitas.

Segundo o presidente da Sabesp, eng.º Oscar Souza Telles, as novas redes foram assentadas de acordo com o Plano Diretor de Esgotos para a Região Metropolitana de São Paulo, um dos setores de obras públicas considerados prioritários pela Administração Paulo Maluf.

Plano Diretor

O diretor-presidente da Sabesp informou ainda que São Paulo conta hoje com uma coleta de esgotos que atende perto de 40% da população. "E essa situação se agrava com o déficit de coletores-tronco e interceptores ao longo dos rios" disse. Entretanto, para ele essa distorção está começando a ser corrigida com o Plano Diretor de Esgotos que "tendo como horizonte o ano 2.000, propõe-se a resolver as deficiências de coleta, interceptação e tratamento dos esgotos na área que abriga cerca de 10% da população brasileira". Numa primeira etapa o plano deverá permitir que a população beneficiada com redes de esgotos passe de 4,5 milhões de habitantes para 7,5 milhões e que o tratamento desses esgotos, hoje atendendo cerca de 500 mil habitantes, passe a atender 5,5 milhões.

Quanto ao tratamento de esgotos, que hoje é feito apenas em nível primário (com remoção de apenas 35% da carga poluidora) passará a ser feito em nível secundário (com remoção de 90% da carga poluidora), através das estações recuperadoras da qualidade da água, em construção no ABC, em Barueri e em Suzano.