Novo metodo de concentração para exames hydrobiologicos

Herm. Kleerekoper

Hydrobiologista da R. A. E. de São Paulo

Os metodos actualmente mais em uso, para a concentração ou filtração de amostras de agua para exames biologicos, são os de "Sedgwick-Rafter" de "Kofoid", da "rede para plankton" e da "centrifuga".

No primeiro metodo, descripto no "Standards Methods of Water Analysis", o meio filtrante é areia de uma determinada composição, quanto ao volume das particulas que a compõem. Esta areia é geralmente uma mistura de quatro granulações obtidas em peneiras com numero differente de malhas por centimetro quadrado. Conforme a proporção das quatro partes, na mistura, e o tamanho das peneiras usadas, obtem-se composições que, durante a filtração, retêm maior ou menor parte do plankton que se acha na agua.

Costumam-se ter varias composições de areia, que são utilizadas de accordo com o tamanho dos organismos a serem retidos

Tratando-se de contagem do plankton, i. é, havendo necessidade de se conhecer o numero de seres ou unidades adoptadas, numa determinada quantidade de agua, o systema Sedgwick-Rafter apresenta varios inconvenientes, não só quanto á parte pratica da filtração, como tambem quanto á exactidão dos resultados.

Processo de Sedgwick-Rafter

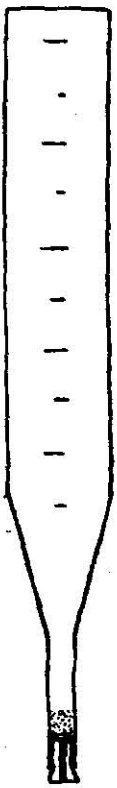
Sobre um pedacinho de panno de seda, fixo numa rolha de borracha perfurada, collocada na extremidade de um tubo cylindrico, de 500 cc de volume, afunilado na parte inferior, é depositada uma quantidade de areia, com uma altura de, pelo menos, 13 mm. (V. a figura). A melhor qualidade de areia é a de quartzo. (Whipple 1927).

Depois de collocado o apparelho numa estante propria, filtra-se uma quantidade de agua conhecida, convindo, por esse motivo, o funil ser graduado.

Esta quantidade depende da qualidade da agua em exame, tendo-se em vista o numero de organismos em suspensão. O primeiro cuidado a tomar, consiste em evitar que a areia seja agitada no acto de se encher o funil. Isto poderia causar a penetração de organismos nella e tornar dificiente a acção do filtro.

Ás vezes é preciso fazer-se um vacuo parcial, para accelerar a filtração, visto esta ser difficil, quando ha muitos organismos microscopicos na agua a ser examinada.

Depois de feita a filtração, tira-se a rolha de borracha e lava-se a areia num copo, com quatidade conhecida de agua destillada.



Quanto menor a quantidade de agua utilizada na lavagem da areia, tanto maior será o chamado grão de concentração da amostra, o qual costuma oscillar, em geral, entre 50 e 100.

Depois de lavada a areia no copo, agita-se este, afim de deslocar os organismos que tiverem adherido a ella. *Faz-se, a seguir, uma decantação, num segundo* copo, para o qual deve-se evitar, tanto quanto possivel, a passagem da areia. Para maior precisão, repete-se a lavagem com nova quantidade de agua, no primeiro copo, decanta-se e junta-se a agua desta segunda lavagem á da primeira. Esta segunda lavagem diminue o grão de concentração.

Da concentração obtida, examina-se uma determinada quantidade (geralmente 1 cc) numa cellula propria, em combinação com uma ocular para contagem; e procede-se á determinação e contagem dos organismos, por meio do microscopio.

Além do processo acima descripto ser trabalhoso, o pesquisador está sujeito a cahir em erros de maior ou menor proporção, peculiares ao metodo. Esses erros são:

I.º *Erro de filtração*, causado pela penetração dos organismos na areia. Este erro poderia ser evitado, theoricamente, usando-se areia de granulação finissima, se não existisse o inconviniente de tal areia ficar em suspensão na agua, e exigir um tempo muito longo para a sua decantação. O erro é geralmente de 5%, tratando-se de amostras normaes. Havendo muitos organismos pequenos, na agua, poderá esta porcentagem ir até 50%.

2.º) *Erro de decantação.* No acto da decantação do primeiro recipiente para o segundo, ficará não sómente certo numero de organismos no primeiro, mas tambem certa quantidade de agua. Estas quantidades perdidas, não sendo proporcionaes, modificarão o resultado final da contagem, resultando num maior ou menor grão de concentração. Com muito cuidado, chega-se a reduzir a 5%, o erro em questão.

Nesse metodo, pode, ainda, haver outras causas de erro, as quaes, porèm, são communs a todos os metodos conhecidos, e tambem ao que passaremos a descrever.

O metodo Sedgwick-Rafter pode dar uma precisão de 10 %, conforme o caso, diminuindo esta precisão de accordo com o caracter da agua em exame.

Processo Kofoid

Kofoid (1903) procurou eliminar os incovenientes praticos e scientificos assignalados acima, com relação á filtração, applicando papel de filtro em vez de areia. O papel, depois da filtração, é lavado com uma determinada quantidade de agua, para deslocar os organismos. Devido á adherencia destes ao papel, o autor do processo não conseguiu augmentar o gráo de precisão, em comparação com o do metodo Sedgwick-Rafter.

De todos os metodos, o da *rede para plankton*, é o que dá resultados menos precisos, e é usado exclusivamente para estudos que não incluem o plankton microscopico (nannoplankton). As malhas da rede deixam passar a maior parte dos pequenos organismos, não sendo, por isso, possivel a sua applicação para o fim a que se destinam os metodos acima descriptos.

O metodo que melhores resultados tem dado é o da *centrifugação*. Varias modalidades existem na applicaéão do principio da centrifugação aos estudos quantitativos do plankton. Todas ellas, porém, são trabalhosas e nem sempre praticaveis, quando se trata de exames rapidos.

Procurando reduzir, o mais possivel, os inconvenientes praticos do metodo Sedgwick-Rafter, que é o metodo adoptado nos serviços officiaes dos E. U., recorreu, o autor deste, ao uso de cadinhos filtrantes, "Jena", tão bem conhecidos nos laboratorios chimicos.

As vantagens resultantes do uso destes cadinhos, como meio filtrante, nos exames hydrobiologicos, são as seguintes:

1° A parte filtrante dos cadinhos é de composição uniforme e de porosidade determinada pelo fabricante. Existem varios numeros de cadinhos, correspondendo a determinados gráos de porosidade, de sorte que, em vez de se preparar varias misturas de areia, de accordo com Sedgwick-Rafter, usam-se filtros já promptos, para os diversos fins dos exames.

2° A concentração é mais rapida que no metodo S-R, dispensando-se os cuidados para evitar a agitação da areia, na passagem do liquido do primeiro recipiente para o segundo.

Neste metodo ha, apénas, um recipiente, o que não sómente simplifica, como tambem elimina uma das causas de erro.

3° A adherencia dos organismos ao fundo filtrante do cadinho é minima, muito especialmente quando se dispõe de cadinhos de fundo lapidado, que são fabricados mediante encommenda especial. (*)

A filtração é feita, fazendo-se passar pelo cadinho, uma determinada quantidade da agua em estudo. Caso seja preciso, poderá ser applicada uma sucção moderada, usando-se, para este fim, um frasco de Woulff.

(*) Este processo differe do de Kolkwitz, que utilisa membranas filtrantes, removiveis, em cadinhos e apparelhos especiaes.

Depois de feita a filtração, lava-se o conteudo do cadinho, afim de serem deslocados os organismos que tenham adherido ao meio filtrante e ás paredes de vidro. Esta lavagem deve ser feita, applicando-se um jacto de agua nas paredes internas do cadinho, mantido com o fundo para cima. A agua da lavagem deve ser recebida num recipiente graduado, annotando-se a quantidade de agua usada, afim de se poder estabelecer o gráo de concentração.

Varias experiencias fôram feitas, comparando-se os resultados obtidos com os verificados no metodo de S-Rafter. O uso dos filtros "Jena", para o fim em questão, poderá ser aperfeiçoado, construindo-se apparelhos proprios para a sua adaptação á filtração hydrobiologica.

Apezar destas experiencias estarem numa phase inicial, têm ellas dado resultados satisfactorios. Não havendo, por emquanto, augmento de precisão, em relação ao metodo S-R, pelo menos ha uma simplificação sensivel na pratica da filtração.

Esses cadinhos têm prestado grandes serviços ao autor, na fixação, lavagem, deshydratação e coloração das Algas. A fragilidade e o tamanho diminuto desses seres não permittem, muitas vezes, a manipulação necessaria para a sua passagem successiva nos diversos liquidos de fixação, etc.

A applicação dos cadinhos filtrantes torna desnecessaria esta manipulação perigosa e frequentemente impossivel.

Em muitas preparações permanentes, feitas pelo autor, pinça, agulhas ou pipetas, só fôram usadas para a inclusão dos organismos nos respectivos meios.

Para isso, o material é collocado num cadinho, cujo fundo poroso é mergulhado no liquido fixador, corante, etc., contido num recipiente, que pode ser um vidro de Borel, cujo diametro corresponde ao do cadinho. Ás vezes, na occasião de se introduzir o cadinho no liquido, pode ficar ar preso em baixo do filtro, o que é causado pela parte saliente do vidro. Esse ar impede a penetração do liquido.

Ha dois meios de se evitar este inconveniente. Um, provisorio, pondo-se um pouco do liquido do recipiente, dentro do cadinho, na occasião deste ser mergulhado. Outro, que é melhor, consiste em se cortar o vidro saliente da parte inferior do filtro, por meio de lapidação.