

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – CSHNB**

**ISAIAS DE SOUSA PAIVA**

**MANUAL PARA COLETA E ANÁLISE DE PERIFITON E NUTRIENTES DA ÁGUA**

PICOS  
2013

ISAIAS DE SOUSA PAIVA

MANUAL PARA COLETA E ANÁLISE DE PERIFITON E NUTRIENTES DA ÁGUA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Me. Paulo César Lima Sales

PICOS  
2013

Eu, **Isaias de Sousa Paiva**, abaixo identificado(a) como autor(a), autorizo a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação abaixo discriminada, de minha autoria, em seu site, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, a partir da data de hoje.

Picos-PI, 12 de novembro de 2013.

  
Assinatura

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca José Albano de Macêdo

**P149m** Paiva, Isaias de Sousa  
Manual para coleta e análise de perifiton e nutrientes  
da água / Isaias de Sousa Paiva. – 2013.  
CD-ROM : il. , 4 1/2 psl. (48 p.)  
Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas) –  
Universidade Federal do Piauí. Picos-PI. 2013.  
Orientador(A): Prof. MSc. Paulo César Lima Sales  
1. Ambiente Aquático. 2. Perifiton. 3. Eutroficação.  
I. Título.

CDD 551.48

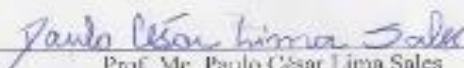
ISAÍAS DE SOUSA PAIVA

MANUAL PARA COLETA E ANÁLISE DE PERIFITON E NUTRIENTES DA ÁGLIA

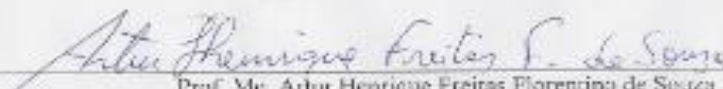
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvécio Nunes de Barros, como requisito parcial para obtenção do título de Graduado em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado em 20/09/2013

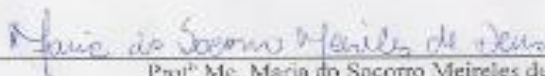
BANCA EXAMINADORA



Prof. Me. Paulo César Lima Sales  
Orientador



Prof. Me. Artur Henrique Freitas Florentina de Souza  
Membro



Prof. Me. Maria do Socorro Meireles de Deus  
Membro

## **DECATÓRIA**

A Deus por guiar e iluminar todos os passos na realização deste trabalho, a minha família que mim acompanharam em todos os momentos na realização deste trabalho.

Dedico a vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente eu agradeço a Deus por cobrir com seu eterno amor e misericórdia em todos os momentos, tanto nas quedas quando levantou mim, como também na vitória e aos momentos felizes no qual mim concedeu. Muito obrigado senhor por permanecer sempre na minha vida.

Depois aos meus pais, Luís Gonzaga de Sousa e Maria do Socorro Paiva e Sousa que com todo amor e dedicação mim acompanharam dando apoio, amor e compreensão na minha longa caminhada.

Agradeço também aos meus irmãos Gildete, José, Mirian, Azimavete, Elias, Elizabete que deram apoio junto comigo, ajudando sempre que podiam com toda dedicação.

Aos meus amigos da universidade Aluísio, Willy, Reginaldo, Lenise, Francisco, Reginaldo, Edinalva, Fabíola, Geane e especialmente a Abiúde Nadabe que mim ajudou muito não só na realização deste trabalho mais sempre estiveram comigo

Ao meu orientador Msc. Paulo César Lima Sales por ter acreditado em mim e me apresentado ao mundo das algas perifíticas, pelo exemplo de profissionalismo e por ter dividido seu conhecimento com paciência e boa vontade estando sempre disponível a contribuir com minha aprendizagem.

Agradeço ao professores Artur Henrique Freitas Florentino de Souza e Maria do Socorro Meireles de Deus que aceitaram participar da banca contribuindo para esse momento tão importante na minha vida.

A todos os professores que contribuíram direto ou indiretamente aumentando meus conhecimentos, crescimento profissional e pessoal.

A todos os amigos e parentes que contribuíram direto ou indiretamente para a realização deste trabalho.

**OBRIGADO A TODOS!!!!!!!**

## RESUMO

O perifíton é definido como uma complexa comunidade de microrganismos constituída por algas, bactérias, fungos, animais e detritos, que se encontra associada a substratos submersos, orgânicos e inorgânicos, vivos ou mortos. Algas perifíticas são muito sensíveis às mudanças na qualidade da água e a diversas variáveis abióticas, como temperatura, nutrientes e velocidade da corrente, tanto direta como indiretamente, por isso são utilizadas frequentemente como bioindicadoras. A presente pesquisa teve como objetivo elaborar um manual para coleta e análise de perifíton e nutrientes da água. Para a elaboração do manual foram consultadas literaturas específicas onde constam metodologias voltadas para o estudo do perifíton. Após a consulta, parte das metodologias foram testadas para sanar qualquer problema durante os procedimentos. São abordados no manual os procedimentos de coleta do perifíton e da água, os materiais utilizados em campo, a metodologia de raspagem da perifíton, bem como de sua fixação. Também foram abordados os procedimentos para análise qualitativa e quantitativa do perifíton, além do peso seco e clorofila  $\alpha$ . Para análise dos nutrientes da água, foram descritas as metodologias para determinação da amônia, nitrito, nitrato, fosfato, nitrogênio total e fósforo total. Desta forma, o manual visa contribuir para a elaboração de uma metodologia específica contendo informações necessárias para o estudo da comunidade perifítica.

**Palavras-Chave:** Ambiente Aquático. Perifíton. Eutrofização.

## ABSTRACT

The periphyton is defined as a complex microbial community consisting of algae, bacteria, fungi, animals and debris, which is associated with submerged substrates, organic and inorganic, living or dead. Periphytic algae are very sensitive to changes in water quality and various abiotic variables such as temperature, nutrients, and current speed, both directly and indirectly, so they are often used as bioindicators. This research aimed to produce a manual for collection and analysis of periphyton and nutrients from the water. For the preparation of the manual, literatures which contain specific methodologies focused on the study of the periphyton were consulted. After the consultation, the methodologies were tested to remedy any problems during the procedures. Are covered in the manual procedures for collecting periphyton and water, the materials used in the field, the methodology for scraping periphyton, as well as its setting. Were also addressed procedures for qualitative and quantitative analysis of the periphyton, and dry weight and chlorophyll  $\alpha$ . For nutrient analysis of water, were described methodologies for determination of ammonia, nitrite, nitrate, phosphate, total nitrogen and total phosphorus. Thus, the manual aims to contribute to the development of a specific methodology containing information necessary for the study of periphyton community.

**Keywords:** Aquatic Environment. Periphyton. Eutrophication.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 O PERIFÍTON.....	12
2.1 Comunidade perifítica.....	12
2.2 Habitat e componentes da comunidade perifítica .....	13
2.3 Importâncias da comunidade perifítica nos ecossistemas aquáticos.....	13
2.4 Estrutura da Comunidade.....	14
2.5 Dinâmica da comunidade.....	16
2.6 Variabilidade sucessional .....	17
3 METODOLOGIA.....	19
4 RESULTADOS E DISCURSÕES .....	20
4.1 Coleta do Peifíton.....	19
4.1.1 MATERIAL DE CAMPO.....	20
4.1.2 PROCEDIMENTOS.....	21
4.1.3 COLETA DO PERIFITON E DA ÁGUA .....	21
4.2 Raspagem e filtragem do Perifíton .....	22
4.3 Análise qualitativa do Perifiton .....	22
4.4 Análise quantitativa do Perifiton .....	22
4.5 Análise dos Nutrientes. ....	23
4.5.1 NITROGÊNIO (AMÔNIA) – NH <sub>3</sub> - MÉTODO DO FENATO .....	23
4.5.2 NITRITO - NO <sub>2</sub> - MÉTODO COLORIMÉTRICO .....	25
4.5.3 NITROGÊNIO (NITRATO) - NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> MÉTODO DA REDUÇÃO POR CÁDMIO.....	29
4.5.4 FÓSFORO TOTAL.....	32
4.5.5 FÓSFORO (MÉTODO DO ÁCIDO ASCÓRBICO).....	33
4.6 Análise da Clorofila $\alpha$ .....	35
4.6.1 Extração da Clorofila $\alpha$ .....	35
4.6.2 Leitura das Amostras .....	35

4.7 Peso Seco Livre de Cinzas .....	36
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS .....	39
ANEXOS.....	42
APÊNDICE .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são de grande importância para o desenvolvimento e proteção da sociedade e das comunidades biológicas que neles vivem. Esses ambientes contribuem significativamente para a produtividade primária, como a formação de matéria orgânica utilizada pelas diferentes comunidades aquáticas. Na região litorânea de lagos e rios são responsáveis por sustentar extensos e diversos bancos de macrófitas, as quais fornecem excelentes habitats para o desenvolvimento da comunidade perifítica (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

O perifíton é definido como uma complexa comunidade de microrganismos constituída por algas, bactérias, fungos, animais e detritos, que se encontra associada a substratos submersos, orgânicos e inorgânicos, vivos ou morto sendo um dos componentes mais produtivos na região litorânea, desempenhando importante papel no metabolismo dos ecossistemas aquáticos (WETZEL, 1983).

Dentro desta comunidade as Algas perifíticas representam um grupo expressivo nos componentes bióticos, destacando-se por sua relevância na produção primária, servindo de base para muitas teias alimentares em ambientes aquáticos. Nesses locais, assembleias de algas perifíticas são afetadas por distúrbios físicos, químicos e biológicos que ocorrem durante seu desenvolvimento (FELISBERTO, 2007; STEVENSON; BAHLS, 1999).

As Algas perifíticas são muito sensíveis às mudanças na qualidade da água e a diversas variáveis abióticas, como temperatura, nutrientes e velocidade da corrente, tanto direta como indiretamente. Sendo utilizadas frequentemente na avaliação do ambiente, principalmente, devido à rápida reprodução e ciclo de vida curto, respondendo as perturbações que venham a ocorrer no meio aquático, em um curto espaço de tempo (FELISBERTO, 2007).

Com relação à disponibilidade de nutrientes, a comunidade perifítica pode afetar a taxa de renovação, promover a transferência de nutrientes entre as zonas pelágica e bentônica e, finalmente, competir com as macrófitas por luz e carbono, e com o fitoplâncton por nutrientes (VANDER-ZANDEN; VADEBONCOUER, 2002; JONES et al., 2002; SAND-JENSEN; BORUM, 1991 apud PELLIGRINI, 2012).

A comunidade perifítica vem sendo apontada como um importante monitor biológico, por fornecer informações às mudanças na qualidade ambiental através das alterações físicas, químicas e biológicas em ecossistemas aquáticos. Além de outras comunidades biológicas, o

perifíton costuma ser usado como bioindicador no monitoramento da eutrofização de lagos e rios (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

O perifíton também é capaz de acumular elementos metálicos e através da análise de sua biomassa torna-se um potencial bioindicador da qualidade ambiental de ambientes aquáticos continentais (FREITAS, 2010).

A comunidade fotoautotrófica componente do perifíton é afetada pelos mesmos componentes que afetam o fitoplâncton, tais como temperatura da água, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes (TUNDISI; TUNDISI, 2008), mas difere-se desta última por desenvolver-se sobre um substrato rochas, plantas, madeira, areia, lama ou sedimentos e até mesmo sobre animais (WEITZEL, 1979). Desta forma, pode-se inferir que o perifíton apresenta resposta as alterações ambientais mais rápidas que o fitoplâncton, devido a sua característica sésil da comunidade, principalmente em ambientes lóticos.

Levando-se em conta a importância do perifíton de acordo com os fatores já supracitados, o presente estudo teve como problema de pesquisa conhecer quais as metodologias padrões utilizadas no estudo da comunidade de algas perifíticas no que concerne à sua coleta e análise, bem como dos fatores físicos e químicos que influenciam na estrutura e composição da comunidade.

A presente pesquisa teve como objetivo geral elaborar um manual para coleta e análise de perifíton e nutrientes da água, e como objetivos específicos (a) descrever os procedimentos de coleta do perifíton e de água em ambientes aquáticos continentais, (b) adaptar a metodologia para obtenção de peso seco livre de cinzas e clorofila  $\alpha$ ; e (c) adequar os procedimentos de fixação do perifíton e análise dos nutrientes da água.

A presente pesquisa apresenta relevância científica pela sua utilidade, uma vez que vem a contribuir com pesquisas voltadas para o estudo da comunidade de algas perifíticas por meio da sistematização de métodos e técnicas de estudo. A importância é principalmente para pesquisas no estado do Piauí, já que na região não há estudos voltados para comunidade perifítica, sendo o resultado deste trabalho uma ferramenta de auxílio para a atividade dos pesquisadores.

O presente trabalho está estruturado em quatro partes. A primeira consiste na revisão de literatura sobre os assuntos abordados na pesquisa. A segunda parte traz uma descrição detalhada da metodologia utilizada. A terceira parte é composta pelos resultados e discussões em forma de manual. A quarta e última parte consiste na conclusão do trabalho.

## 2 O PERIFÍTON

### 2.1 Comunidade periférica

O termo perifiton designa uma fina camada aderida a elementos que se encontra submersa na água. Estes podem ser as macrófitas aquáticas, rochas, areias presentes nos rios, riachos, lagos, represas, além de objetos artificiais, como por exemplo, vidro e plásticos (CORDEIRO 2012).

Historicamente, o primeiro termo utilizado para descrever esta comunidade foi “sésil”. Posteriormente, a terminologia “*aufwuchs*”, referente a organismos imóveis que não penetram no substrato foi utilizada (MOSCHINI-CARLOS, 1999). Em 1924, Behning utilizou “perifiton” para designar os organismos que colonizam substratos introduzidos pelo homem em rios (CORDEIRO, 2012). Esta terminologia foi adotada para todos os organismos aquáticos que vivem aderidas a superfícies submersas (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS; 2003).

Em 1982, foi realizado o 1º Workshop Internacional sobre comunidades aderidas, onde o termo perifiton consagrou como sendo uma complexa comunidade de micro-organismos (algas, bactérias, fungos e animais), aderidos a substratos inorgânicos ou orgânicos, vivos ou mortos (WETZEL, 1983).

Dependendo do substrato no qual o perifiton se desenvolve, podemos classificá-los em seis tipos principais: (1) epilíton, sobre rochas; (2) epipélon, sobre lama ou sedimentos; (3) epfíton, crescendo sobre plantas; (4) epizoon, sobre substrato animal; (5) epidendron, sobre madeira; e (6) epipsâmon, crescendo sobre areia (WEITZEL, 1979).

Diversas terminologias mais específicas vêm sendo utilizadas como epilíton, epifíton, e episamon, que são termos usados para a comunidade que cresce aderida a substratos rochosos, vegetais e arenosos (SCHWARZBOLD; ESTEVES; PANSOSSO, 1990). Dessa forma, padronizar o tipo de substrato onde a comunidade perifítica está fixada torna-se relevante nos estudos ecológicos, pois o tipo de substrato utilizado, este, pode intervir diretamente na composição da comunidade, selecionando espécies melhor adaptada ao ambiente (IOWE; PAN, 1996; FISHER; DUNBAR, 2007).

## **2.2 Habitat e componentes da comunidade periférica**

O perifíton é considerado um biofilme ou bioderme que varia em espessura e se desenvolve em superfície de rochas, em vegetação ou em qualquer substrato submerso em água doce ou salobra e também em superfícies úmidas. É comumente observado como “manchas” ou “tapetes” ou “cabeleiras” verdes, verde-amareladas, ou marrons em diversos substratos, seja em regiões tropicais, temperadas, desérticas e polares (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

Para (WETZEL, 1990) a comunidade perifítica corresponde, algas de todas as classes, principalmente algas filamentosas, unicelulares e coloniais, que apresentem estruturas de fixação), as quais podem corresponder de 95 a 99% de toda a comunidade. No entanto, muitos componentes heterotróficos como, por exemplo, protozoários sésseis ou livres, fungos, bactérias e alguns outros animais com poucos centímetros de comprimento, os quais, apesar de não estarem incluídos na definição, fazem parte dos processos da comunidade e são considerados nos estudos (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

## **2.3 Importâncias da comunidade periférica nos ecossistemas aquáticos**

A comunidade perifítica é considerada um dos principais produtores responsáveis pela produtividade primária nos ecossistemas aquáticos, principalmente em riachos e lagoas, o qual pode contribuir com cerca de 70 a 90% da produtividade primária total; é importante fonte de matéria orgânica, pois constitui-se a base da cadeia alimentar desses ambientes por sua biomassa ser utilizada por outros organismos. Portanto, sua biomassa é de grande valor nos estudos da produtividade primária, visto que, espécies com grande biomassa passam a ter forte influência na transferência de energia e de matéria para os demais níveis tróficos do ecossistema (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

Segundo Lowe e Pan (1996), as mudanças na biomassa em dado momento são usadas como estimativas indiretas da produtividade. Sendo a clorofila  $\alpha$ , pigmento presente em todos os grupos de algas, é utilizada como estimativa de biomassa, tanto para o fitoplâncton, como para o perifíton. No caso da comunidade perifítica, a quantificação de sua estrutura pode ser baseada na avaliação não apenas da enumeração de indivíduos vivos, mas também através da biomassa (Wetzel, 1983; Watanabe, 1990).

Diversos estudos têm apontado a importância da comunidade perifítica nos ecossistemas aquáticos. Por serem primeiramente autotrófico; segundo, por desempenhar um papel fundamental, promovendo uma relação entre os componentes químicos, física e biológica (LOWE; PAN, 1996).

Outra relevância do perifíton como bioindicador da qualidade da água e de seu estado trófico também foram relatados por outros estudos, principalmente para rios e lagos (COSTA; MACHADO; FERNANDES, 2007). Os resultados evidenciam que o perifíton é capaz de acumular grandes quantidades de substâncias poluentes como inseticidas, herbicidas (FERNANDES; ESTEVES, 2011). Existem alguns benefícios de se utilizar o perifíton como bioindicador em estudos ambientais; primeiro, por apresenta modo de vida sésil e curto ciclo de vida; segundo, fazendo com que respondam rapidamente às mudanças ambientais se comparados aos organismos planctônicos; terceiro, a elevada riqueza de espécies confere a esta comunidade maior gama de resposta às alterações nos ambientes (FERRAGUT; BICUDO, 2009).

Apesar de toda esta importância, ainda há escassez de informações sobre a comunidade perifítica, especificamente no que tange o processo dinâmico da comunidade. Tal evento se deve à extrema heterogeneidade e, nos variados habitats litorâneos, os quais por sua vez, são mais suscetíveis às flutuações das variáveis abióticas. Outro fator importante é o fato da própria comunidade ser composta por organismos muito diversos, autotróficos e heterotróficos; mesmo entre as algas, há representantes usuais de todas as divisões, o que torna mais difícil a identificação dos mesmos e a compreensão de suas relações ecológicas (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

## **2.4 Estrutura da Comunidade**

A maior parte dos estudos com o perifíton visa avaliar a estrutura da comunidade representada em sua grande parte por algas que compõem cerca de 90% do total da sua composição (COSTA; MACHADO; FERNANDES, 2007). O estudo da comunidade é descrita através dos seus principais atributos: riqueza específica, composição, frequência de ocorrência, densidade total, dominância, abundância, diversidade, específica, e equitabilidade (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

A composição da comunidade de algas perifíticas apresenta dinâmica espacial e temporal diretamente associada às condições hidrológicas, o estado trófico da água, a turbulência, a velocidade da corrente, a sazonalidade, a intensidade da luz, a herbivoria e a

competição intra e interespecífica (RODRIGUES et al., 2005 apud CAVITE; FERNANDES, 2008).

No entanto, a análise dos fatores que atuam sobre as comunidades biológicas, com base na descrição das espécies que as compõem, vem sendo contestada por diversos autores devidos muitas vezes não expressar resultados claro dessa comunidade as variações das condições ambientais (CORDEIRO, 2012). Além disso, as espécies possuem combinações de traços funcionais que evoluíram entre elas, as quais define sua história de vida e habilidade competitiva, denominada de estratégias de vida (GRIME, 1979; BURLIGIA, 2010).

A proposição sobre os grupos funcionais da comunidade de algas perifíticas é muito recente, e são escassos os trabalhos disponíveis sobre o tema (BURLIGA, 2010). Pioneiramente, McCormick (1996) na tentativa de alocar grupos do perifiton, descreveu quatro estratégias ecológicas, onde levou em consideração as estratégias de vida, recursos e distúrbios da comunidade perifíticas. Contudo, Biggs et al. (1998) apud Burliga (2010) sugeriu a distribuição das espécies nos seguintes grupos: C estrategista- reunindo espécies com maior potencial competitivo, sendo mais abundante em ambientes eutróficos e estáveis; C-S estrategistas – melhor adaptado a ambientes mesotróficos e estáveis; S estrategistas – agrupamento de espécies mais abundante em ambientes oligotróficos e estáveis e R estrategistas – mais abundantes em ambientes mesotróficos e sistemas moderadamente a muito instáveis com distúrbios frequentes.

Alguns estudos têm apontado à precipitação pluviométrica como o principal fator responsável por alterar a estrutura da comunidade perifíticas. Fonseca e Rodrigues (2005) aferiram a influência da precipitação sobre a densidade da comunidade de algaperifítica em diferentes ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná. Esta mesma influência foi observada por Cavati e Fernandes (2008) analisando a escala espacial e temporal da comunidade de algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno). Leadrini, Fonseca e Rodrigues (2008) analisaram a influência do período de cheia e seca sobre a biomassa perifítica, concluíram que o pulso de inundação tem sido a principal força reguladora da produtividade nos sistemas rios-área.

Recentemente novas abordagens vêm avaliando a biomassa do perifiton (FERRAGUT; BICUDO 2009; MARTINS; FERNANDES 2007, FELISBERTO, 2007; SIQUEIRA, 2008), através da determinação do peso seco livre de cinzas (= matéria orgânica), pigmentos fotossintetizantes (clorofila “a” e outros) e biovolume total. Segundo Fernandes e Esteves (2011), as características orgânica e inorgânica do perifiton e seu estado heterotrófico ou autotrófico permitem discussões sobre a real importância da comunidade perifítica nos



sistemas aquáticos. Quanto ao biovolume, permite analisar a real contribuição de algas de maior ou de menor tamanho nos processos dinâmicos do sistema.

## 2.5 Dinâmica da comunidade

O perifíton possui uma comunidade bastante dinâmica, que inclui processos internos autotróficos e heterotróficos simultaneamente em sua bioderme, podendo a sua composição sofrer influência constante da chuva e seca. Desta forma, sua interação ecológica deve ser avaliada com escalas de tempo que envolva as taxas de mudança na composição de espécies e biomassa. Sendo a variabilidade sucessional da comunidade perifítica um dos processos mais estudados pelos pesquisadores (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

Burkholder (1996) destaca que as propriedades químicas e físicas do substrato podem influenciar a estrutura e o funcionamento do perifíton. Por isso, entender esta relação ajuda na compreensão da resposta do perifíton às condições ambientais e no aprimoramento de possíveis programas de biomonitoramento.

Estudos demonstram que a comunidade perifítica sofre as mesmas alterações que afetam a comunidade fitoplancônica. Temperatura da água, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes são alguns dos fatores fundamentais no crescimento, reprodução e sucessão das algas perifíticas (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

Portanto, a temperatura da água tem efeito direto sobre o perifíton, podendo este estar adaptado a diferentes condições de luminosidade. Dessa maneira, comunidades adaptadas a baixas intensidades luminosas apresentam crescimento mais lento, mas a biomassa acumulada final é quase a mesma das comunidades adaptadas a intensidades luminosas mais altas e com crescimento mais rápido (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

Marcus (1980) estudando a comunidade periférica em resposta a eutrofização na jusante do Reservatório Hyalite, em Montana, Estados Unidos, demonstrou que as descargas no córrego estimulou a produtividade, aumentou as proporções de clorofila *a* nos acúmulos orgânicos e aumentou a diversidade de espécies de diatomáceas. Além disso, o autor observou que o aumento da diversidade ocorre quando as condições de enriquecimento se aproximam do ponto ótimo, seguido do declínio na diversidade quando o ótimo é ultrapassado. A dominância de diatomáceas perifíticas em sítios menos ricos também demonstrou ser uma competição entre táxons com eficiências diferentes na aquisição e incorporação de baixas concentrações de nitrogênio.

Segundo Fernandes e Esteves (2011), a comunidade perifítica é heterogênea, com padrões generalizados na colonização e na sucessão. Estudos de colonização e sucessão registram três fases básicas nesse processo. A primeira fase, a fase inicial, é caracterizada pela colonização de organismos de pequeno porte e elevada taxa de crescimento, como algas unicelulares e bactérias. A segunda fase, denominada fase exponencial, é representada pela colonização de algas unicelulares de maior tamanho, algas coloniais e filamentosas, com morfologia mais complexa. Já na última fase, a fase madura ou estacionária, apresenta maior complexidade formas, maior número de organismos e ocorrência de perifíton secundário.

Vários trabalhos evidenciam a influência de eventos de distúrbios na estabilidade da comunidade de algas perifíticas. Peterson e Stevenson (1992) avaliaram a importância da duração do distúrbio na resistência e resiliência da comunidade de algas perifíticas. A influência do distúrbio hidrológico também foi observada no estudo de Murakami, Bicudo e Rodrigues (2009) onde observaram o efeito da perturbação hidrológica na estabilidade de algas perifíticas durante 10 anos.

## **2.6 Variabilidade sucessional**

Um dos processos mais estudados pelos pesquisadores é a variabilidade sucessional da comunidade perifítica. O estabelecimento da comunidade perifítica nos substratos tende a ocorrer da seguinte forma: com estrutura simples nos estágios iniciais, e as trocas com o meio circundante são muito importantes, dominada por bactérias e algas com alta taxa de crescimento, com o decorrer do tempo, as espécies com tempo de geração mais longo vão se estabelecendo e as trocas com o meio se tornam pouco significantes Fernandes e Esteves (2011).

Ressalta-se que distúrbios como turbulência provocada pelo vento e/ou por intensa precipitação e os pulsos de inundação podem representar reversões nas fases sucessionais, fazendo o processo regredir a estágios iniciais devido à desagregação dos organismos. Perdas na comunidade perifítica são representadas, principalmente por herbivoria e desprendimento mecânico do material Fernandes e Esteves (2011).

Vários trabalhos têm evidenciado a importância do perifíton na produtividade total de lagos e rios. Destacam-se os estudos de Ferragut et al.(2011), que compararam sazonalmente a biomassa e a composição química do perifíton sobre substrato artificial e pecíolo de *Nymphaea* spp. e *Utricularia foliosa* e, mais recentemente, o trabalho sobre Variação sazonal

da biomassa, do estado nutricional e da estrutura da comunidade de algas perifíticas desenvolvida sobre substrato artificial e *Utricularia foliosa* feito por Santos (2012).

### 3METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma pesquisa descritiva onde procurou-se elaborar um manual para coleta e análise de perifíton e nutrientes em ambientes aquáticos continentais.

Para a elaboração do manual foram consultadas literaturas específicas onde constam metodologias voltadas para o estudo do perifíton. Após a consulta, parte das metodologias foram testadas para sanar qualquer problema durante os procedimentos.

O manual foi dividido em três partes: A primeira trata dos procedimentos de coleta do perifíton e amostras de água do ambiente; A segunda trata da análise fixação e análise do perifíton em laboratório; A terceira trata da análise química dos nutrientes encontrados na água, bem como da determinação da clorofila  $\alpha$  e peso seco livre de cinzas.

Para análise do perifíton foram abordadas as metodologias para:

- a) Análise qualitativa: consiste na identificação dos táxons;
- b) Análise quantitativa: consiste na abundância de cada táxon;
- c) Peso seco livre de cinzas.
- d) Clorofila  $\alpha$ .

Para a análise dos nutrientes da água foram abordadas as metodologias para:

- a) Amônia;
- b) Nitrato;
- c) Nitrito;
- d) Nitrogênio total;
- e) Fosfato;
- f) Fósforo Total.

Para a análise dos nutrientes da água, foram utilizadas as metodologia padrões contidas nos Métodos Padronizados para o Exame de Água e Esgoto (Standard Methods for the examination of water and wastewater) de 1998, com tradução livre de Leonardo L. Ribeiro.

## **4 RESULTADOS E DISCURSÕES**

A presente sucessão traz o conteúdo pertencente ao manual no que concerne a coleta e análise do perifíton e água de ambientes aquáticos continentais.

Todas as informações contidas referem-se a coleta de perifíton em tréplica de apenas um ponto amostral, sendo que para mais pontos esta quantidade deve ser extrapolada.

### **4.1 Coleta do Perifíton**

As coletas não podem ser efetuadas sob a influência de enxurradas. Por este motivo, sempre que ocorrer uma enxurrada espera-se o tempo necessário, até que a transparência da água permita ver o fundo (INAG, 2008).

#### **4.1.1 MATERIAL DE CAMPO**

- Macacão pantaneiro;
- Pinça;
- Tesoura de poda;
- 12 frascos de plástico com boca larga (aproximadamente 250 ml);
- 3 frascos de plástico de 1000 ml;
- Água destilada;
- Frasco de esguicho para água destilada;
- Fita própria para etiquetar;
- Ficha de campo;
- Disco de secchi;
- Isopor;
- Gelo;
- Sonda multiparamétrica com sensores de (temperatura, condutividade, ph, oxigênio dissolvido);
- Sistema de posicionamento global (gps);
- Máquina fotográfica.

#### 4.1.2 PROCEDIMENTOS

1. Preencher o cabeçalho da ficha de campo;
2. Aferir com sonda simples/multiparamétrica a temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/l), pH e condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ );
3. Medir as coordenadas através do GPS;
4. Medir a transparência utilizando o disco de Secchi;
5. Etiquetar todos frascos contendo o nome da instituição; dia, mês e ano; pontos de coleta;
6. Enumerar os frascos para análise da clorofila  $\alpha$ , peso seco, qualidade, quantidade e análise físico-químico da água;
7. Colocar um pouco de água destilada para arejar o ambiente interno do frasco antes de introduzir o substrato no frasco;
8. Selecionar um local onde ocorre a menor interferência no ecossistema;
9. Fechar bem, se necessário com parafilme, e armazenar os frascos em isopor contendo gelo seco;
10. Reservar um isopor com gelo específico para cada ponto de coleta, evitando assim possíveis erros ou trocas de materiais de diferentes pontos de coleta;
11. Terminar o preenchimento da ficha de campo;
12. Transportar as amostras para o laboratório, preferencialmente no próprio dia da amostragem e tomando todas as precauções para assegurar a integridade da amostra entre a colheita e a análise;

#### 4.1.3 COLETA DO PERIFITON E DA ÁGUA

1. Escolhe o local onde o ambiente sofre menos influência da ação antrópica;
2. Selecione ramo e/ou substrato de macrófitas semelhantes em textura e tamanho, evitando-se os substratos expostos;
3. Com o auxílio de uma pinça e tesoura, retire possíveis restos de folha presente no pecíolo que possa alterar a comunidade perifíticas durante a raspagem;
4. Coloque o ramo dentro do frasco até topar no fundo e depois levante um pouco e corte-o de forma que o tamanho dos substrato sejam semelhantes;
5. Colete em cada frasco de 250 mL, um pecíolo de macrófita em estado adulto, distribuídos de forma aleatória para análise sendo;
6. Colete em cada frasco de 1000 L água próximo aos local de coleta do perifíton;

7. Acondicione o frasco contendo o perifiton no isopor com gelo específico para cada ponto de coleta;

#### **4.2 Raspagem e filtragem do Perifiton**

1. Retire o pecíolo do frasco e raspe suavemente em uma placa de Petri utilizando uma lâmina de bisturi coberta com papel alumínio;
2. Acondicione o líquido obtido no mesmo frasco para fazer a filtragem;
3. Após a raspagem e acondicionamento do líquido, merça a área do pecíolo;
4. Filtre a amostra na bomba a vácuo utilizando micro Filtro de Fibra de Vidro – Wharman GF/C (diâmetro 47 mm, poro 0,5 µm, Cat. No. 1822047);
5. Utilize filtros calcinados para a filtragem das amostras para a análise do peso seco;
6. Use filtros não calcinados para a filtragem das amostras para a análise do clorofila  $\alpha$ ;
7. Após a filtragem Dobrar e guardar os filtros em papel alumínio, com todas as informações necessárias: Data, Ponto de Coleta e Número da coleta;
8. Guardar os filtros no freezer e analisar em até 3 meses;

#### **4.3 Análise qualitativa do perifiton**

1. Utilize os mesmos procedimento de raspagem descrito no item 4.2;
2. Acondicione-o no mesmo frasco de coleta;
3. Fixe o líquido obtido utilizando sete a oito gotas de solução *transeau* para uma amostra de 50 ml;
4. Coloque - o na geladeira a uma temperatura de 4°C;
5. Utilize o microscópio ótico para a análise e identificação do perifiton;

#### **4.4 Análise quantitativa do Perifiton**

1. Utilize os mesmos procedimento de raspagem descrito no item 4.2;
2. Acondicione-o no mesmo frasco de coleta;
3. Fixe o líquido obtido utilizando sete a oito gotas de solução lugol acético 0,5% para uma amostra de 50 ml;
4. Enrole-o em papel alumínio e coloque na geladeira a uma temperatura de 4°C;
5. Utilize o microscópio invertido para contagem do perifiton;

## 4.5 Análise dos Nutrientes.

### 4.5.1 NITROGÊNIO (AMÔNIA) – $\text{NH}_3$ - MÉTODO DO FENATO

#### I. Discussão Geral

- a. Princípios: Um composto intensamente azul, indofenol, é formado pela reação de amônia, hipoclorito, e fenol, catalizado por nitroprussiato de sódio.
- b. Interferências: Complexando magnésio e cálcio com citrato elimina a interferência produzida pela precipitação desses íons em pH alto. Não há interferência de outras formas trivalentes de nitrogênio. Remova a turbidez interferente por destilação ou filtração. Se sulfito de hidrogênio está presente, remova acidificando as amostras para pH 3 com HCl diluído e aeração vigorosa até que o odor de sulfito não possa ser detectado.

#### II. Aparelhos

Espectrofotômetro para uso a 640 nm com caminho óptico de 1 cm ou maior.

#### III. Reagentes

- a) Solução de Fenol: Misture 11,1 mL de fenol liquefeito ( $\geq 89\%$ ) com álcool etílico 95% v/v para um volume final de 100 mL. Prepare semanalmente. CUIDADO: use luvas e proteção para os olhos quando manusear o fenol; use boa ventilação para minimizar toda exposição pessoal a essa substância tóxica volátil.
- b) Nitroprussiato de Sódio, 0,5% p/v: Dissolva 0,5 g de nitroprussiato de sódio em 100 mL de água deionizada. Armazenar em frascos âmbar por até um mês.
- c) Citrato alcalino: Dissolva 200 g de citratotrisódico e 10 g de hidróxido de sódio em água deionizada. Dilua para 1000 mL.
- d. Hipoclorito de Sódio, solução comercial, cerca de 5%. Esta solução se decompõe lentamente uma vez que o selo na tampa da garrafa é quebrado. Substitua a cada 2 meses.
- e. Solução oxidante: Misture 100 mL da solução de citrato alcalino com 25 mL de hipoclorito de sódio. Prepare diariamente.
- f) Solução-estoque de amônia: Dissolva 3,819 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  anidro (seco a  $100^\circ\text{C}$ ) em água, e dilua para 1000 mL; 1,00 mL = 1,00 mg N = 1,22 mg de  $\text{NH}_3$ .



g) Soluções-padrão de amônia: Use a solução-estoque de amônia e água para preparar uma curva de calibração numa faixa apropriada para as concentrações das amostras.

#### IV. Procedimento

Para uma amostra de 25 mL em um erlenmeyer de 50 mL, adicione, com intensa agitação após cada adição, 1 mL da solução de fenol, 1 mL da solução de nitroprussiato, e 2,5 mL da solução oxidante. Cuba as amostras com uma tira de filme plástico ou de parafina. Deixe a cor desenvolver a temperatura ambiente (22 a 27°C) ao abrigo da luz por pelo menos 1 h. A cor é estável por 24 h. Meça a absorbância a 640 nm. Prepare um branco e pelo menos dois outros padrões diluindo a solução estoque de amônia dentro da faixa de concentração das amostras. Trate os padrões como amostras.

#### V. Cálculos

Prepare uma curva-padrão plotando as leituras de absorbância dos padrões contra as concentrações de amônia dos mesmos. Calcule as concentrações das amostras comparando a absorbância das amostras com a curva-padrão.

#### VI. Sugestão para curva de calibração

A partir da solução-estoque de amônia (1,22 mg/mL = 1220 mg/L), prepare um litro de solução intermediária de 1000 mg/L completando 820 mL da solução para 1000 mL. Diluindo-se 1 mL da solução intermediária para um litro, tem-se a solução padrão de 1,0 mg/L. Para obter os padrões de 0,500, 0,200, 0,100, 0,050, 0,020, 0,010, mg/L, prepare diluições do padrão de 1,0 mg/L como demonstrado abaixo.

Padrão mg/L	Pipetar ml	Para mL
0.500	50	100
0.100	10	100
0.050	5	100
0.020	2	100
0.010	1	100

## 4.5.2 NITRITO- $\text{NO}_2^-$ - MÉTODO COLORIMÉTRICO

### I. Discussão Geral

a) Princípio: Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) é determinado através da formação de um azo roxo avermelhado lavado produzido em pH de 2,0 a 2,5 combinando sulfanilamida diazotizada com N-(1-naphthyl) -ethylenediaminadihydrochloride (NED dihydrochloride). A amplitude aplicável deste método para medidas espectrofotométricas é de 10 a 1000  $\mu\text{g NO}_2^-$ -N/L. Medidas fotométricas podem ser feitas para a amplitude de 5 a 50  $\mu\text{g NO}_2^-$ -N/L se um caminho óptico de 5 cm em um filtro de cor verde são usados. O sistema de cor obedece a lei de Beer acima de 180  $\mu\text{g NO}_2^-$ -N/L com um caminho óptico de 1 cm a 543 nm. Concentrações de  $\mu\text{g NO}_2^-$  mais elevadas podem ser determinadas diluindo a amostra.

b) Interferências: incompatibilidade química o torna distinguível quando  $\text{NO}_2^-$ , cloreto livre, e tricloreto de nitrogênio ( $\text{NCl}_3$ ) coexistirem.  $\text{NCl}_3$  apresenta uma falsa cor vermelha quando o reagente de cor é adicionado. Os seguintes íons interferem por causa da precipitação sobre condições de teste e devem estar ausentes:  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ , cloroplatinato ( $\text{PtCl}_6^{2-}$ ), e metavanadato ( $\text{VO}_3^{2-}$ ). Íon cúprico pode causar baixos resultados por catalisar a decomposição do sal de diazônio. Íons coloridos que alteram o sistema de cor também devem estar ausentes. Remova os sólidos suspensos por filtração.

c) Armazenamento de amostras: Nunca use preservação ácida para amostras a serem analisadas para  $\text{NO}_2^-$ . Faça a determinação prontamente em amostras frescas para prevenir a conversão bacteriana de  $\text{NO}_2^-$  para  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_3$ . Para preservação de curta duração de 1 a 2 dias, congele a  $-20^\circ\text{C}$  ou armazene a  $4^\circ\text{C}$ .

### II. Aparelhos

a) Equipamento colorimétrico: um dos seguintes é necessário:  
Espectrofotômetro, para uso a 543 nm, provendo um caminho óptico de 1 cm ou maior.

b) Fotômetro de filtro, provendo um caminho óptico de 1 cm ou maior e equipado com um filtro verde tendo uma transmitância máxima próximo a 540 nm.

### III. Reagentes

a). Água livre de nitrito: Se não se sabe que a água destilada ou desmineralizada está livre de  $\text{NO}_2^-$ , use um dos seguintes procedimentos para preparar água livre de nitrito:

1) Adicione a 1 L de água destilada um pequeno cristal de  $\text{KMnO}_4$  e tanto  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  ou  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Redestile em um aparelho todo de vidro de borosilicato e descarte os 50 mL iniciais do destilado. Colete a fração destilada que está livre de permanganato; uma cor vermelha com reagente PDP (Secção 4500-Cl.F.2b) indica a presença de permanganato.

2) Adicione 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc e 0,2 mL de uma solução de  $\text{MnSO}_4$  (36,4 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}/100$  mL de água destilada) a cada L de água destilada, e torne róseo com 1 a 3 mL de solução de  $\text{KMnO}_4$  (400 mg  $\text{KMnO}_4/\text{L}$  de água destilada). Redestile como descrito no parágrafo anterior. Use água livre de nitrito na preparação de todos os reagentes e diluições.

b) Reagente de cor: para 800 mL de água, adicione 100 mL de ácido fosfórico 85% e 10 g de sulfanilamida. Depois de dissolver a sulfanilamida completamente, adicione 1 g de N-(1-Naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride. Misture para dissolver, então dilua para 1 L com água. A solução é estável por cerca de um mês quando guardado em um frasco escuro no refrigerador.

c) Oxalato de Sódio, 0,025 M (0,05 N): Dissolva 3,350 g de  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , grade padrão primária, em água e dilua para 1000 mL.

d) Sulfato de Ferro II e Amônio, 0,05 M (0,05 N): Dissolva 19,607 g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  mais 20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc em água e dilua para 1000 mL. Padronize como na secção 5220B.3d.

e) Solução-estoque de Nitrito: O reagente comercial de grade  $\text{NaNO}_2$  ensaia em menos de 99%. Devido ao  $\text{NO}_2^-$  ser oxidado prontamente na presença de umidade, use uma garrafa limpa de reagente para preparar e armazenar a solução-estoque e mantenha as garrafas vedadas contra o livre acesso de ar quando não em uso. Para determinar o conteúdo de  $\text{NaNO}_2$ , adicione um excesso conhecido da solução padrão de  $\text{KMnO}_4$  0,01 M (0,05 N) (ver h abaixo), descarregue a cor do permanganato com uma quantidade conhecida do padrão redutor como  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  0,025 M ou  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,05 M, e contra-titule com a solução-padrão de permanganato.

1) Preparação da solução-estoque – Dissolva 1,232 g de  $\text{NaNO}_2$  em água e dilua para 1000 mL; 1,00 mL = 250  $\mu\text{g}$  N. Preserve com 1 mL de  $\text{CHCl}_3$ .

2) Padronização da solução-estoque de nitrito – Pipete, na ordem, 50,00 mL do  $\text{KMnO}_4$  0,01 M (0,05 N) padrão, 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc, e 50,00 mL da solução-estoque de  $\text{NO}_2^-$  em um frasco ou garrafa de vidro esmerilhado. Submirja a ponta da pipeta bem abaixo da superfície da solução ácido-permanganato enquanto adicionar a solução-estoque de  $\text{NO}_2^-$ .

Agite gentilmente e aqueça a 70-80°C em uma chapa aquecedora. Descarregue a cor do permanganato adicionando porções de 10 mL suficientes do padrão de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 0,025 M. Titule o excesso de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> com KMnO<sub>4</sub> 0,01 M (0,05 N) para o ponto de viragem róseo pálido. Faça um branco com água durante o procedimento e faça as correções necessárias no cálculo final como mostrado na equação abaixo.

Se a solução padrão do sulfato de ferro II e amônio 0,05 M for substituída por Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, omita o aquecimento e extenda o período de reação entre KMnO<sub>4</sub> e o Fe<sup>2+</sup> para 5 min antes de fazer a titulação final do KMnO<sub>4</sub>.

Calcule o conteúdo de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N da solução-estoque pela seguinte equação:

$$A = \frac{[(B \times C) - (D \times E)] \times 7}{F}$$

onde:

A = mg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N/L na solução-estoque de NaNO<sub>2</sub>,

B = mL total de KMnO<sub>4</sub> usado,

C = normalidade do KMnO<sub>4</sub> padrão,

D = mL total do redutor padrão adicionado.

E = normalidade do redutor padrão, e

F = mL da solução estoque de NaNO<sub>2</sub> usada na titulação.

A cada 1,00 mL de KMnO<sub>4</sub> 0,01 M (0,05 N) consumido pela solução de NaNO<sub>2</sub> corresponde a 1750 µg de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N.

f) Solução Intermediária de Nitrito: Calcule o volume G da solução-estoque de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> requerido para a solução intermediária de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> de  $G = 12,5/A$ . Dilua o volume G (aproximadamente 50 mL) para 250 mL com água; 1,00 mL = 50 µg N. Prepare diariamente.

g) Solução Padrão de Nitrito: Dilua 10,00 mL da solução intermediária de nitrito para 1000 mL com água; 1,00 mL = 0,500 µg N. Preparar diariamente.

h) Titulante Padrão de permanganato de Potássio, 0,01 M (0,05 N): Dissolva 1,6g de KMnO<sub>4</sub> em 1 L de água destilada. Mantenha em uma garrafa esmerilhada âmbar e envelheça por pelo menos uma semana. Decante cuidadosamente ou pipete o sobrenadante sem suspender o sedimento. Padronize esta solução freqüentemente pelo seguinte procedimento:

Pese à 0,1 mg mais próxima várias amostras de 100 a 200 mg de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> anidro em béqueres de 400 mL. Para cada béquer, por sua vez, adicione 100 mL de água destilada e misture para dissolver. Adicione 10 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 + 1 e aqueça rapidamente de 90 a 95°C. Titule rapidamente com a solução de permanganato a ser padronizada, enquanto agita, para

um ponto de virada levemente róseo que persiste por pelo menos 1 min. Não deixe a temperatura cair abaixo de 85°C. Se necessário, aqueça os conteúdos dos béqueres continuamente durante a titulação; 100 mg consumirá cerca de 6 mL de solução. Corra um branco com água destilada e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

$$\text{Normalidade do KMnO}_4 = \frac{\text{g Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{(\text{A} - \text{B}) \times 0,33505}$$

onde:

A = mL do titulante para a amostra, e

B = mL do titulante para o branco.

Tire a média dos resultados de várias titulações.

#### IV. Procedimentos

a. Remoção dos Sólidos Suspensos: se a amostra contém sólidos suspensos, filtre através de uma membrana de filtro com 0,45 µm de diâmetro de poro.

b. Desenvolvimento da cor: se o pH da amostra não está entre 5 e 9, ajuste para esta amplitude com HCl 1 N ou NH<sub>4</sub>OH quando necessário. Para 50 ml de amostra, ou uma porção diluída para 50 mL, adicione 2 mL do reagente de core misture.

c. Medida fotométrica: entre 10 min e 2 h depois de adicionar o reagente de cor às amostras e padrões, meça a absorvância a 543 nm. Como uma guia, use os seguintes caminhos ópticos para as concentrações de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N indicadas:

Caminho óptico cm	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N µg/L
1	2-25
5	2-6
10	<2

#### V. Cálculos

Prepare uma curva-padrão plotando as absorvâncias dos padrões contra as concentrações de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N. Calcule as concentrações das amostras a partir da curva.

#### 4.5.3 NITROGÊNIO (NITRATO) - $\text{NO}_3^-$ MÉTODO DA REDUÇÃO POR CÁDMIO

##### I. Discussão geral

a. Princípio:  $\text{NO}_3^-$  é reduzido quase quantitativamente a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) na presença de cádmio (Cd). Este método usa grânulos de cádmio comercial tratado com sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e acondicionado em uma coluna de vidro.

O produzido então é determinado pela diazotização com sulfanilamida e conjugação com N-(1-naphthyl)-ethylenediaminedihydrochloride para formar um azo dye altamente colorido que é medido colorimetricamente. Uma correção deve ser feita para qualquer  $\text{NO}_2^-$  presente na amostra pela análise sem o passo da redução. A amplitude aplicável deste método é de 0,01 a 1,0 mg  $\text{NO}_3^-$ -N/L. O método é recomendado especialmente para níveis de  $\text{NO}_3^-$  abaixo de 0,1 mg N/L, onde outros métodos perdem acurácia.

b. Interferências: Materiais suspensos na coluna restringirão o fluxo da amostra. Para amostras túrbidas, ver ¶A.1. Concentrações de ferro, cobre, ou outros metais acima de várias miligramas por Litro reduzem a eficiência da coluna. Adicione EDTA às amostras para eliminar esta interferência. Óleo e graxas cobrirão a superfície do Cd. Remova pela pré-extração com um solvente orgânico (ver Secção 5520) O cloreto residual pode interferir oxidando a coluna de Cd, reduzindo sua eficiência. Cheque amostras por cloreto residual (ver métodos de DPD na Secção 4500-Cl). Remova o cloreto residual adicionando uma solução de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) (Secção 4500- $\text{NH}_3$ .B.3d). A cor da amostra que absorve a cerca de 540 nm interfere.

##### II. Aparelhos

a. Coluna redutora: Compre ou construa a coluna\* (Figura 4500-  $\text{NO}_3^-$ :1) a partir de uma pipeta volumétrica de 100 mL removendo a porção superior. A coluna também pode ser construída com duas peças de tubo juntas pelas extremidades: junte um tubo de 10 cm de comprimento e 3 cm de DI com um de 25 cm de comprimento e 3,5 cm de DI. Adicione uma válvula para controlar o fluxo.

b. Equipamento colorimétrico; Um dos seguintes é necessário:

1) Espectrofotômetro, para uso a 540 nm, provendo um caminho óptico de 1 cm ou maior.

2) Fotômetro de filtro, provendo um caminho óptico de 1 cm ou maior e equipado com um filtro tendo uma transmitância máxima próximo a 540 nm.

### III. Reagentes

a. Água livre de nitrato: Use água redestilada ou destilada e deionizada de alta pureza. A absorvância do branco com os reagentes preparada com esta água não deve exceder 0,01. Use-a para preparar todas as soluções e diluições.

b. Grânulos de cobre-cádmio: lave 25 g de grânulos de Cd novos ou usados, com granulação de 20 a 100<sup>†</sup> com HCl 6N e rinse com água. Mexa o Cd com 100 mL de uma solução de CuSO<sub>4</sub> 2% por 5 min ou até a cor azul parcialmente esvanecer. Decante e repita com CuSO<sub>4</sub> fresco até um precipitado coloidal marrom começar a se desenvolver. Gentilmente lave com água para remover todo o Cu precipitado.

c. Reagente de cor: Prepare como explicado na Secção 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>B.3b.

d. Solução de cloreto de amônio-EDTA: Dissolva 13 g de NH<sub>4</sub>Cl e 1,7 g de Etilenodiaminatetraacetatodissódico (EDTA) em 900 mL de água. Ajuste o pH para 8,5 com NH<sub>4</sub>OH conc e dilua para 1 L.

e. Solução diluída de cloreto de amônio-EDTA: Dilua 300 mL da solução de NH<sub>4</sub>Cl-EDTA para 500 mL com água.

f. Ácido hidrolórico: HCl, 6N.

g. Solução de sulfato de cobre, 2%: Dissolva 20 g de CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O em 500 mL de água e dilua para 1 L.

h. Solução estoque de nitrato: Seque nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) em um forno a 105°C por 24 h. Dissolva 0,7218 g em água e dilua para 1000 L; 1,00 mL = 100 µg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Preserve com 2 mL de CHCl<sub>3</sub>/L. Esta solução é estável por pelo menos 6 meses.

i. Solução intermediária de nitrato: Dilua 100 mL da solução estoque de nitrato para 1000 mL com água. 1,00 mL = 10,0 µg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N. Preserve com 2 mL de CHCl<sub>3</sub>/L. Esta solução é estável por 6 meses.

j. Solução estoque de nitrito: ver Secção 4500- NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. B.3e.

k. Solução intermediária de nitrito: ver Secção 4500- NO<sub>2</sub>.B.3f.

l. solução de nitrito funcional: Dilua 50,0 mL da solução intermediária de nitrito para 500 mL com água livre de nitrito; 1,00 mL = 5 µg NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N.

#### IV. Procedimento

a. Preparação da coluna de redução: Insira uma lâ de vidro na base da coluna de redução e encha com água. Adicione uma quantidade adequada de grânulos de Cu-Cd para produzir uma coluna de 18,5 cm de comprimento. Mantenha a água acima do nível dos grânulos de Cu-Cd para prevenir o aprisionamento de ar. Lave a coluna com 200 mL da solução diluída de  $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ . Ative a coluna passando por ela a 7-10 mL/min, pelo menos 100 mL de uma solução composta por 25% de um padrão de  $1,0 \text{ mg NO}_3^- \text{-N/L}$  e 25 % da solução de  $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$ .

b. Tratamento da amostra:

1) Remoção da turbidez – filtre amostras túrbidas através de uma membrana com 45  $\mu\text{m}$  de diâmetro de poro. Teste os filtros contra contaminação por nitrato.

2) Ajuste do pH. Ajuste o pH entre 7 e 9, quando necessário, usando um pH-metro e HCl ou NaOH diluídos. Isto certifica um pH de 8,5 após a adição da solução de  $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$

3) Redução da amostra: para uma amostra de 25,0 mL ou uma porção diluída para 25 mL, adicione 75 mL da solução de  $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$  e misture. Passe a mistura pela coluna e colete a uma taxa de 7 a 10 mL/min. Descarte os primeiros 25 mL. Colete o restante no frasco original. Não há a necessidade de lavar a coluna entre as amostras, mas se a coluna não for reusada por algumas horas ou mais, passe 50 mL da solução diluída de  $\text{NH}_4\text{Cl-EDTA}$  até o topo e deixe- passar através do sistema. Guarde a coluna de Cu-Cd nesta solução e nunca a deixe secar.

4) Desenvolvimento da cor e sua mensuração – tão breve quanto possível, e não mais do que 15 min após a redução, adicione 2,0 mL do reagente de cor a 50 mL da amostra e misture. Entre 10 min e 2 h, mensure a absorbância à 543 nm contra um branco de água destilada e reagentes. NOTA: Se a concentração de  $\text{NO}_3^-$  exceder a curva padrão (cerca de 1 mg N/L) use a amostra reduzida restante para preparar uma diluição apropriada e análise novamente.

c. Standard: Use a solução intermediária de  $\text{NO}_3^- \text{-N}$ , prepare padrões numa amplitude de 0,05 1,0 mg  $\text{NO}_3^- \text{-N/L}$  diluindo os seguintes volumes para 100 mL em frascos volumétricos: 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, e 10,0 mL. Faça a redução dos padrões exatamente como descrita para as amostras. Compare pelo menos um padrão de  $\text{NO}_2^-$  com um padrão de  $\text{NO}_3^-$



reduzido na mesma concentração para verificar a eficiência da coluna. Reative os grânulos de Cu-Cd como descrito no 3b acima quando a eficiência da coluna cair abaixo de 75%.

## V. Calculos

Obtenha uma curva padrão plotando a absorbância dos padrões contra as concentrações de  $\text{NO}_3^-$ -N. Compute as concentrações das amostras a partir da curva padrão. Reporte como miligramas de N oxidado por litro (a soma do  $\text{NO}_3^-$ -N mais  $\text{NO}_2^-$ -N) a menos que a concentração de  $\text{NO}_2^-$ -N seja determinada separadamente e subtraída.

### 4.5.4 FÓSFOROTOTAL

#### I. Método da digestão por persulfato

##### a. Aparelhos:

- 1) Chapa aquecedora: uma superfície aquecedora de 30 x 50 cm é adequada.
- 2) Autoclave: uma autoclave ou panela de pressão capaz de desenvolver de 98 a 137 kPa pode ser usada no lugar da chapa aquecedora.
- 3) Scoop de vidro: para manter a quantidade requerida de cristais de persulfato.

##### b. Reagentes:

- 1) Solução aquosa do indicador fenolftaleína.
- 2) Solução de ácido sulfúrico 30%. Adicione cuidadosamente 300 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc a 600 mL de água destilada e dilua para 1 L com água destilada.
- 3) Persulfato de amônio,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ , sólido, ou persulfato de potássio,  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , sólido.
- 4) Hidróxido de sódio, NaOH, 1 N.

**c. Procedimento:** use 50 mL ou uma porção avaliável de uma amostra mista. Adicione 0,05 mL (1 gota) da solução de indicador fenolftaleína. Se uma coloração avermelhada se desenvolve, adicione  $\text{H}_2\text{SO}_4$  30% gota a gota para descarregar a cor. Então adicione 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  30% e 0,4 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  ou 0,5 g de  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ .

Ferva gentilmente numa placa preaquecida por 30-40 min ou até que um volume final de 10 mL seja alcançado. Compostos organofosforados como AMP podem requerer de 1,5 a 2 h para uma digestão completa. Resfrie, Dilua para 30 mL com água destilada, adicione 0,05

mL (1 gota) da solução de indicador fenolftaleína, e neutralize para uma coloração rósea pálida com NaOH. Alternativamente, aqueça por 30 min em uma autoclave ou panela de pressão a 98-137 kPa. Resfrie, adicione 0,05 mL (1 gota) da solução de indicador fenolftaleína, e neutralize para uma coloração rósea pálida com NaOH. Dilua para 100 mL com água destilada. Em algumas amostras, um precipitado pode se formar neste estágio, mas não filtre. Para qualquer subdivisão subsequente da amostra, agite bem. O precipitado (que é possivelmente um fosfato de cálcio) redissolve em condições ácidas to teste colorimétrico do teste do fósforo reativo. Determine o fósforo pelos Métodos C, D ou E, para os quais uma curva de calibração tenha sido construída pela análise de padrões tratados pela digestão com persulfato.

#### 4.5.5 FÓSFORO (MÉTODO DO ÁCIDO ASCÓRBICO)

##### I. Discussão Geral

a. Princípio: Molibdato de amônio e tartarato de potássio e antimônio reagem em meio ácido com ortofosfato para formar um heteropoliácido – ácido fosfomolibdico – que é reduzido para uma intensa coloração azul de molibdênio pelo ácido ascórbico.

b. Interferentes: Arsenatos reagem com o reagente molibdato para produzir uma coloração azul similar à formada com o fosfato. Concentrações tão baixas quanto 0,1 mg As/L interferem com a determinação do fosfato. Cromo hexavalente e  $\text{NO}_2^-$  interferem para dar resultados cerca de 3% abaixo em concentrações de 1 mg/L e de 10 a 15% abaixo a 10 mg/L. Sulfida ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) e silicato não interferem a concentrações de 1,0 e 10 mg/L.

c. Concentração mínima detectável: Aproximadamente 10  $\mu\text{g P/L}$ . As amplitudes de P são de:

Amplitudede	
P	Caminho
Aproximada	Óptico
<i>mg/L</i>	<i>Cm</i>
0,30-2,00	0,5
0,15-1,30	1,0
0,01-0,25	5,0

## II. Aparelhos

a. Equipamento colorimétrico: um dos seguintes é necessário:

1) Espectrofotômetro, com foto tubo infravermelho para uso a 880 nm, com um caminho óptico de 2,5 ou maior.

2) Fotômetro de filtro, equipado com um filtro vermelho e um caminho óptico de 0,5 cm ou maior.

b. Vidraria lavada com ácido.

## III. Reagentes

a. Ácido sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5N: Dilua 70 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc para 500 mL de água destilada.

b. Solução de tartarato de potássio e antimônio: dissolva 1,3715 g de  $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  em 400 mL de água destilada em um balão volumétrico de 500 mL e ajuste para este volume. Guardar em uma garrafa com tampa esmerilhada.

c. Solução de molibdato de amônio: Dissolva 20 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  em 500 mL de água destilada. Guardar em uma garrafa com tampa esmerilhada.

d. Ácido ascórbico, 0,1M: Dissolva 1,76 g de ácido ascórbico em 100 mL de água destilada. A solução é estável por cerca de uma semana à 4°C.

e. Reagente combinado: Misture os reagentes acima nas seguintes proporções para 100 mL de reagente combinado: 50 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N, 5 mL da solução de tartarato de potássio e antimônio, 15 mL da Solução de molibdato de amônio, e 30 mL da solução de ácido ascórbico. Misture após a adição de cada reagente. Deixe todos os reagentes alcançarem a temperatura ambiente antes de eles serem misturados e adicione-os na ordem apresentada. Se turbidez se forma no reagente combinado, agite e deixe descansar por alguns minutos até a turbidez desaparecer antes do procedimento. O reagente é estável por 4 h.

f. Solução estoque de fosfato: Dissolva em água destilada 219,5 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro e dilua para 1000 mL; 1,00 mL = 50,0  $\mu\text{g PO}_4^{3-}\text{-P}$ .

g. Solução padrão de fosfato: Dilua 50,0 mL da solução estoque de fosfato para 1000 mL com água destilada; 1,00 mL = 2,50  $\mu\text{g P}$ .

#### IV. Procedimento

a. Tratamento da amostra: pipete 50,0 mL da amostra em um tubo de ensaio limpo e seco ou em um erlenmeyer de 125 mL. Adicione 0,05 mL (1 gota) do indicador fenolftaleína. Se ficar vermelho, adicione a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N gota a gota até descarregar a cor. Adicione 8,0 mL do reagente combinado e agite vigorosamente. Depois de no mínimo 10 min, mas não mais que 30 min, mezure a absorvância de cada amostra à 880 nm, usando um branco com os reagentes como referência.

b. correção para a turbidez ou coloração interferente: A cor natural da água geralmente não interfere no alto comprimento de onda empregado. Para águas com alto nível de coloração ou túrbidas, prepare um branco adicionando todos os reagentes exceto o ácido ascórbico e o tartarato de potássio e antimônio à amostra. Subtraia o valor da absorvância do branco da absorvância de cada amostra.

c. Preparação da curva de calibração: Prepare curvas padrão individuais para uma série de seis padrões com as amplitudes de fosfato indicadas no 1c acima. Use um branco de água destilada com o reagente combinado para fazer as leituras fotométricas para a curva de calibração. Plote a absorvância VS. concentração de fosfato para dar uma linha reta passando pela origem. Teste pelo menos um padrão de fosfato com cada bateria de amostras.

#### V. Cálculos

$$\text{mg P/L} = \frac{\text{mg P (em aproximadamente 58 mL)} \times 1000}{\text{de volume final}} \times \frac{\text{mL de amostra}}{\text{mL de amostra}}$$

#### 6. Precisão e vieses

A precisão e os valores dos vieses dados na Tabela 4500-P:I são para um procedimento com uma simples solução dados na 13ª edição. O presente procedimento difere nas razões reagente-amostra, e sem adição de solvente, e condições ácidas. É superior em precisão e vieses à técnica anterior na análise tanto de água destilada quanto de água de rio a uma concentração de 228 µg P/L (Tabela 4500-P:II).

## 4.6 Análise da Clorofila A

### 4.6.1 Extração da clorofila

1. Coloque o filtro no almofariz com a ajuda de uma pinça. Depois macere-o com o auxílio da pistilo no escuro a uma temperatura ambiente, utilizando o acetona 90% como dissolvente.
2. Posteriormente a maceração o extrato é transferido para um tubo de 10 ml.
3. Coloque o tubo contendo as 10 ml numa centrifugador a 5000 rpm durante dez minutos.
4. Após a centrifugação faz-se a leitura do extrato no espectrofotômetro Shimadzu UV-210 A nos comprimentos de onda 663 e 750 nm.
5. Após a leitura adicione sete a oito gotas de ácido clorídrico para obter a acidificação da amostra.
6. Utilize a equação de LORENZEM (1967) para obter as concentrações de clorofila  $\alpha$ .
7. Deixe os tubos ao abrigo da luz na geladeira por 24 horas.

### 4.6.2 Leitura das amostras

1. Utilize acetona 90% como branco.
2. Ler as absorbâncias em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663 e 750 nm.
3. Após a leitura, coloque as amostras em recipiente pequeno, acidificar com algumas gotas de HCl (1,0 ou 0,5 N) até o pH baixar para 2,6-2,8 (controlar com potenciômetro ou indicador de pH).
4. Ler a amostra acidificada nos mesmos comprimentos de onda (665 e 750 nm)

$U_{665}$  = absorbância do extrato antes da acidificação no  $\lambda = 665$  nm

$U_{750}$  = absorbância do extrato antes da acidificação no  $\lambda = 750$  nm

$A_{665}$  = absorbância do extrato depois da acidificação no  $\lambda = 665$  nm

$A_{750}$  = absorbância do extrato depois da acidificação no  $\lambda = 750$  nm

V = volume do etanol utilizado (10ml)

F = fator para equiparar a redução em absorbância para a concentração inicial da clorofila  
( $R/R-1 = 1,7/1-1,7 = 2,39$ )

K = coeficiente de absorção da clorofila-a para etanol ( $1000/87 = 11,49$ )

V = volume da água filtrada (L)

L = comprimento da cubeta (cm)

### **Cálculo da clorofila-a (Lorenzen, 1967)**

$$\text{Cl-a } (\mu\text{g/l}) = \frac{[(U_{665} - U_{750}) - (A_{665} - A_{750})] \cdot v \cdot F \cdot K}{V \cdot L}$$

V. L

### **4.7 Peso Seco Livre de Cinzas**

1. Calcine o filtro na mufla durante duas horas a uma temperatura de 450°C.
2. Pese-o na balança analítica e anote o valor encontrado.
3. Filtre o material raspado, em filtros de fibra de vidro (GF/C), previamente calcinados.
4. Leve o material obtido à estufa a 70°C por um período de aproximadamente 72 horas e pese obtendo assim o peso seco (PS).
5. Leve novamente o filtro para a mufla por duas horas a 450°C e pese-o para obter o peso seco de cinzas (PSC).
6. Após a mufla, pese o filtro novamente e a diferença entre peso seco inicial (PS) e o peso após a combustão (PSC) constituiu o peso seco livre de cinzas (PSLC).

## 5 CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a elaboração de um manual específico para coletar e analisar do perifiton e os nutrientes aquáticos, servirá de auxílio para os estudos da comunidade perifíticas e dos ambientes aquáticos, indicando os níveis de eutrofização das lagoas e rios.

Dessa forma, o manual utilizado favoreceu uma metodologia específica contendo todas as informações necessárias para a realização da coleta sistemática do perifiton em ambiente aquático bem como a análise laboratorial da clorofila  $\alpha$ , peso seco, qualidade e quantidade da comunidade perifítica e nutrientes. Por conseguinte, também foi possível adequar a preparação de soluções para a análise dos nutrientes e do perifiton de forma a facilitar o desenvolvimento do trabalho e ao mesmo tempo minimizar possíveis erros com o perifiton nas pesquisas futuras.

Dentre as dificuldades encontradas menciona-se a ausência de um laboratório equipado específico para realizar a análise do perifiton e dos nutrientes sendo necessário, portanto, adequar os laboratórios existentes da melhor maneira possível procurando suprir as necessidades do estudo. Ainda enfatiza-se que esse trabalho pode influenciar positivamente na aquisição de bens e materiais laboratoriais para serem utilizados no desempenho das próximas pesquisas nesse campo de atuação do biólogo.

## REFERÊNCIAS

- BIGGS, B. J. F., R. J. STEVENSON, AND R. L. LOWE. 1998. **A habitat matrix conceptual model for stream periphyton**. *Archiv Fur Hydrobiologie* 143:21-56.
- BURLIGA, A. L. Abordagem dos grupos funcionais nos estudos do perifíton e do fitoplâncton. In: FRANCESCHINI, I. M. et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Porto Alegre: Artmed, p. 233-258, 2010.
- CORDEIRO, R.S. **Estabilidade e persistência da comunidade de algas perifíticas em ecossistemas lênticos e lóticos do semiárido brasileiro[manuscrito]**. 135f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e Saúde, 2012.
- COSTA, A. G; MACHADO, R. G. & FERNANDES, V. O. **Estrutura e dinâmica temporal da comunidade de algas perifíticas em substrato artificial na lagoa maimbá, guarapari-es**. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu. Anais...Caxambu: SEB, 2007.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- FELISBERTO, S. A. **Algas perifíticas sobre substrato artificial e natural no rio do corvo (tributário do reservatório de rosana): composição, abundância, biomassa e produtividade**. 110f. Curso de Pós-graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Fundação Universidade Estadual de Maringá. Tese (Doutorado). Maringá-Paraná, 2007.
- FERNANDES, V. O, CAVATI, B. Algas perifíticas em dois ambientes do baixo rio Doce (lagoa Juparanã e rio Pequeno Linhares, Estado do Espírito Santo, Brasil):variação espacial e temporal.**Acta Scientiarum. BiologicalSciences** v. 30, n. 4, p. 439-448, 2008.
- FERRAGUT, C. & BICUDO, D.C.Efeito de diferentes níveis de enriquecimento por fósforo sobre a estrutura da comunidade perifítica em represa oligotrófica tropical (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Botânica**, 32: p. 571-585, 2009.
- FERRAGUT, C. RODELLO, A.F. & BICUDO, C.E.M. Seasonal variability of periphyton nutrient status and biomass on artificial and natural substrates in a tropical mesotrophic reservoir. **Acta Limnologica Brasiliensia** 22: p. 397-409, 2011.
- FISHER, J; DUNBAR, M.J. Towards a representative periphytic diatom sample. **Hidrology and Earth Systems Science**, 11: 399-407, 2007.
- FONSECA, I. A, RODRIGUES. L. Comunidade de algas perifíticas em distintos ambientes da planície de inundação do alto rio Paraná. **Acta Scientiarum. BiologicalSciences**, v.27, p. 21-28, 2005.
- FREITAS, A. P. P. **Algas perifíticas como indicadoras de qualidade em ambientes impactados pela drenagem ácida de minas na região carbonífera de Santa Catarina**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.



GRIME, J. P. Plant strategies and vegetation processes. Chichester: John Wiley & Sons, 1979. 222p.

INAG, I.P. **Manual para a avaliação da qualidade biológica da água. Protocolo de amostragem e análise do fitoplâncton.** Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P. 2009.

INAG, I.P. Manual para a avaliação da qualidade biológica da água em sistemas fluviais segundo a Diretiva Quadro da água. **Protocolo de amostragem e análise para macroinvertebrados bentônicos.** Ministério do Ambiente, Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional. Instituto da Água, I.P. 2008

JOANN M. BURKHOLDER AND HOWARD B. GLASGOW, Jr: *Limnol Oceanogr.*,42(5,part 2), 1997, 1052-1075, by the American Society of: *Limnol. Oceanogr. Inc: Pjesteriapiscicida and other Pfesteria-like dinoflagellates': Behavior, impacts, and environmental controls 1997.*

JONES, J. I; YOUNG, J.O; EATON, J.W; MOSS, B. 2002. The influence of nutrient loading, dissolved inorganic carbon and higher trophic levels on the interaction between submerged plants and periphyton. *Journal of Ecology*, vol. 90, p. 12-24. <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-0477.2001.00620.x>

KRAUSE-JENSEN & SAND-JENSEN SAND: *LimnolOceanogr.* 43(3).1998.396-407, by the American Society of: *Limnol. Oceanogr. Inc: Light attenuation and photosynthesis of aquatic plant communities 1998.*

LEANDRINI, J, A; RODRIGUES, L. Temporal variation of periphyton biomass in semilotic environments of the upper Paraná River floodplain. **ActaLimnol. Bras.** , v.20: 21-28. 2008.

LORENZEN, C. J. Determination of chlorophyll and pheo-pigments: Spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.**, v.12, p.343-346. 1967.

LOWE, R. L. & PAN, Y.**Benthic algal communities as biological monitors.** In: Stevenson, R. J.; Bothwell, M. L. & Lowe, R. L. (eds.). *Algal Ecology: freshwater benthic ecosystems.* San Diego: Academic Press, p. 705-739, 1996.

MARCUS, M. D. **Periphytic community response to chronic nutrient enrichment by a reservoir discharge.** *Ecology.* v. 61, n. 2, p. 387-399, 1980.

MARTINS, F.C.O; FERNANDES, V.O. Estrutura da comunidade de algas perifíticas em substrato natural da lagoa da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil= Structureoftheperiphyticalgaecommunity in natural substratumofthelagoonofthe Federal Universityof Espírito Santo, Brazil. **Neotropical: Biology And Conservation**, São Leopoldo, RS , v.2, n.1 , p.11-20,, abr. 2007.

McCORMICK, P.V. Resource competition and species coexistence in freshwater benthic algal assemblages. In **algal ecology, freshwater benthic ecosystems** (R.J. Stevenson, M.L Bothwell e R. L Low, eds.). Academic Press, New York, p.229-252, 1996.

MOSCHINI, C. V. **Importância, estrutura e dinâmica da comunidade perifítica nos ecossistemas aquáticos continentais.** In: POMPÊO, M. L. M. (Org.) **Perspectivas da Limnologia no Brasil**, São Luís: Gráfica e Editora União, 1999, cap. 6. Disponível em: <<http://www.ib.usp.br/limnologia/Perspectivas/>>. Acesso em: 15 agosto. 2013.

MURAKANI, E.A., BICUDO, D.C.; RODRIGUES, L. **Periphytic algae of the Graças Lake, Upper Paraná River floodplain: comparing the years 1994 and 2004.** *Brazilian Journal of Biology*, v 69, p. 459-468, 2009.

PELLIGRINI, B.G. **Influência da heterogeneidade espacial sobre a estrutura e estado nutricional (C, N, P) da comunidade perifítica em substrato natural (Nymphaeaspp).** p.95. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2012.

PETERSON, C.G.; STEVENSON, R.J. Resistance and residence of lotic algal communities: importance of disturbance timing and current. *Ecology*, v, 73, p. 1445-1461, 1992.

POMPÊO, M. L. M; MOSCHINI – CARLOS, V. **Macrófitas aquáticas e perífiton, aspectos ecológicos e metodológicos.** São Carlos: Rima. 124p. 2003.

PORTUGAL. Instituto da Água – INAG/I.P. Manual para avaliação biológica da água: protocolo de amostragem e análise para fitoplâncton. Ministério do Meio Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional, 2009. Disponível em: <[http://dqa.inag.pt/documentacaooficial\\_PORTUGAL\\_Fitoplancton.html](http://dqa.inag.pt/documentacaooficial_PORTUGAL_Fitoplancton.html)>. Acesso em: 23 maio 2012

RIBEIRO. L.L. Tradução parcial do **Standard Methods for the examination of water and wastewater.** 1998.

SANTOS, T. R. **Variação sazonal da biomassa, do estado nutricional e da estrutura da comunidade de algas perifíticas desenvolvida sobre substrato artificial e Utricularia foliosa L.** p.79. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. São Paulo, 2012.

SCHWARZBOLD, A.; ESTEVES, F. A.; PANOSSO, R. F. Relações entre peso seco e clorofila a do perífiton em função de diferentes idades e épocas de coletas de pecíolos de *Eichhornia azurea* Kunth. *Boundary Layer Meteorology*, v. 3, p. 493-515, 1990.

SIQUEIRA, N. S.; RODRIGUES, L. Biomassa perifítica em tanques-rede de criação de tilápia do Nilo – *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). **Boletim do Instituto de Pesca.** São Paulo, v. 32, n. 2, p. 181-190, 2009.

STEVENSON, R. J.; BAHLS, L. L. Periphyton protocols. In: BARBOUR, M. T. et al. **Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish.** 2 ed. Washington: EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency, 1999. Cap. 6. Disponível em: <<http://water.epa.gov/scitech/monitoring/rsl/bioassessment/index.cfm>>. Acesso em: 13 maio. 2013.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia.** São Paulo: Oficina de Textos, 2008.

VANDER-ZANDEN & VADEBONCOUER: *Limnol. Oceanogr.* 48(4), 2003, 1408–1418 q 2003, by the American Society of Limnology and Oceanography, Inc. From Greenland to green lakes: **Cultural eutrophication and the loss of benthic pathways in lakes 2003.**

VIVIANE MOSCHINI-CARLOS, RAOUL HENRY & MARCELO L. M. POMPÊO *Hydrobiologia* **434**: 35–40, 2000. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. **Seasonal variation of biomass and productivity of the periphytic community on artificial substrata in the Jurumirim Reservoir (São Paulo, Brazil) 2000.**

WATANABE, T. Perifiton: comparação de metodologias empregadas para caracterizar o nível de poluição da água. **Acta Limnol. Brasil.**, v.3, p.593 – 615, 1990.

Wetzel, R. G. Opening remarks. In: Wetzel, R.G. (Ed.). **Periphyton of freshwater ecosystems**. The Hague, Dr.W. Junk, 1983, p. 3-4. (Developments in Hydrobiology, 17).

Wetzel, R.G. Land-water interfaces: metabolic and limnological regulators. *Verh. Int. Rev. Limnol.*, 24: 6-24, 1990.

## ANEXO I

## Ficha de Campo (Perifiton)

Ponto de Coleta:		Estação do Ano		Data		
		Manhã (M)		Hora de Início		Fim
Código		Tarde (T)		Coletor ou Técnico		

Condições Metodológicas			pH	
			Temperatura do ar °C	
Sol		Sem vento	Condutividade (µS/cm)	
Pouco Nublado		Vento fraco	Profundidade de Secchi (m)	
Muito Nublado		Vento moderado	OD (% sat)	
Chuva		Vento forte	OD (mg/L)	

Cordenadas(GPS)	Longitude:	Latitude:
-----------------	------------	-----------

Controle de Qualidade (assinalar com X)	
1. A ficha de campo foi preenchida corretamente	
2. O número de frasco para cada ponto estão correto	
3. Todo o material colhido se encontra armazenado	
4. Todos os frascos estão etiquetados	
5. Todos os frascos estão fechados de forma correta	
6. Os instrumentos de colheita encontram se todos lavados	

Observações:
--------------

## ANEXO II

Ficha de Laboratório (Perifiton)
----------------------------------

A. Identificação Taxonômica e Quantificação do Perifiton			
Data:	Ponto de Coleta:	Número da amostragem:	
Nome do Pesquisador e/ou Técnico que efetuou a identificação:			

Taxon	Especie
-------	---------

Número Total de Espécies	









