

# Estimativa da densidade valvar de diatomáceas em lâminas permanentes e em câmaras de sedimentação: qual método utilizar?

MORO<sup>1</sup>, R. S. & BICUDO<sup>2</sup>, C. E. M

1- Universidade Estadual de Ponta Grossa – Departamento de Biologia Geral – Caixa Postal 992 – Ponta Grossa, PR – CEP 84.010-970 - rsmoro@uepg.br.

2- Instituto de Botânica – Seção de Ficologia – Caixa Postal 4005 – São Paulo, SP – CEP 01061-970 cbicudo@terra.com.br

**RESUMO: Estimativa da densidade valvar de diatomáceas em lâminas permanentes e em câmaras de sedimentação: qual método utilizar?** Devido as controvérsias geradas na estimativa da densidade valvar de diatomáceas (Bacillariophyta) em sedimentos, avaliou-se comparativamente os dois métodos preconizados na literatura: a) contagens em transectos longitudinais em lâminas permanentes; b) contagens em campos aleatórios em câmaras de sedimentação. O primeiro possui como maior vantagem a possibilidade de trabalhar com aumentos de 1.000 vezes ou mais, utilizando a objetiva de imersão, permitindo uma melhor quantificação de formas pequenas. A desvantagem deste método seria a agregação dos indivíduos sob a lamínula. Com relação ao uso da câmara de sedimentação, a principal vantagem seria uma melhor distribuição de organismos, embora muitas vezes a contagem tenha de ser conduzida sob menores aumentos. Após comparar uma dupla leitura de 69 amostras, através de análises não paramétricas de correlação (Kendall e Spearman) e teste de Kolmogorov-Smirnov, concluiu-se não haver diferença significativa entre as contagens obtidas pelos dois métodos e ambos poderiam ser utilizados na estimativa da densidade valvar. Valores obtidos a partir de contagens realizadas em câmara de sedimentação poderiam ser utilizados sempre que seja necessário correlacionar a densidade valvar absoluta a qualquer outro fator físico, biológico ou químico. Os valores obtidos a partir das contagens realizadas em lâminas permanentes, com um maior nível de detalhamento, poderiam ser empregados em termos de densidade valvar, absoluta ou relativa, por exemplo, nas análises de estrutura de comunidades.

**Palavras-chave:** sedimentos, densidade valvar, diatomáceas

**ABSTRACT: Estimation of the diatom valve density on permanent slides or in settling chambers: which method to choose?** The purpose of this study was to compare two methods used to estimate diatom valve density: a) by counting along continuous transects in permanent slides; b) by counting from a number of selected randomic fields of view in settling chambers. The main advantage of the first method is that it allows to work with high magnification (X 1000 and over) with more accurate taxonomic quantification. The disadvantage of this method could be the valve aggregation on the coverslip. The second method could provide an evenly valve distribution, although ordinary inverted microscopes allow only small magnifications. By means of the double non-parametric analysis of 69 sediment samples (Kendall and Spearman correlation and Test of Kolmogorov-Smirnov), it was concluded that there was no significant difference between the results of the two methods and both could be employed on estimating valve density. Counts obtained from settling chambers could be used whenever it is necessary to correlate the absolute valve density to any other physical, biological or chemical factor. Counts obtained from transects in permanent slides could be used both as absolute or relative valve density, for instance, in the community structure analysis.

**Key-words:** sediment, valve density, diatoms

---

## Introdução

As algas diatomáceas (Bacillariophyta) são os microrganismos mais largamente analisados nos sedimentos lacustres, de turfeiras ou estuarinos, especialmente em investigações paleoecológicas, ou paleolimnológicas. Nesses estudos, procede-se rotineiramente à identificação e contagem de frústulas (Indivíduos inteiros) ou, mais freqüentemente, valvas, uma vez que os processos de oxidação da amostra normalmente separam as frústulas nos seus dois componentes, a epiteca e a hipoteca.

Os métodos utilizados para estimar a densidade de diatomáceas têm gerado controvérsias. A estimativa pode ser feita através de contagens realizadas em campos aleatórios ou transectos em lâminas permanentes, desde que o volume da alíquota empregada e a área contada sejam conhecidos (Battarbee, 1986). A vantagem mais evidente deste último método é a possibilidade de trabalhar com aumentos de 1.000 vezes ou mais, utilizando a objetiva de imersão do microscópio, permitindo uma quantificação mais segura, especialmente dos organismos de pequenas dimensões. No entanto, Battarbee (1973) afirmou que a técnica da evaporação da amostra sobre uma lamínula não garante a dispersão aleatória dos indivíduos, devido à interação entre as forças de convecção sobre a lamínula e a tensão superficial do líquido. Esta condição ocasiona o deslocamento dos indivíduos muito pequenos para as bordas da lamínula. Van Landingham, por sua vez, afirmou que, embora freqüentemente as valvas de menor tamanho sejam deslocadas para a periferia da lamínula pelas correntes de convecção geradas durante o processo de evaporação, outras dessas valvas poderiam ser redistribuídas no centro da lamínula quando a última porção de água evaporasse (Bradbury, 1973).

A estimativa pode também ser feita a partir de contagens realizadas em campos aleatórios ou em transectos em câmaras de sedimentação de volume conhecido em microscópio invertido (Lund *et al.*, 1958). Neste caso, obtém-se uma melhor distribuição das valvas, mas as análises freqüentemente são conduzidas sob aumentos de 400 vezes ou pouco mais, pois microscópios atuais, com maiores recursos, podem não estar disponíveis.

Este trabalho tem como objetivo avaliar comparativamente os resultados dos dois processos de cálculo da densidade valvar, através de contagens em lâminas permanentes e em câmaras de sedimentação.

---

## Material e Métodos

As amostras provieram de um testemunho de 12 metros retirado da Lagoa Dourada, Ponta Grossa, PR (Moro & Bicudo, 1998), o qual foi sub-amostrado em 69 porções de 1cm<sup>3</sup> cada. As pastilhas (*pelets*) obtidas foram oxidadas com 2,0 ml de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 volumes, sob temperatura de 50°C por 24 horas (Battarbee, 1986). Após repetidas lavagens por centrifugação, as sub-amostras oxidadas tiveram seu volume preenchido com água destilada até 20ml. Deste volume, dividiu-se metade para cada prova.

### 1. Lâminas permanentes

Uma alíquota de 1 ml (0,2 ml do volume oxidado e 0,8 ml de água destilada) foi deixada evaporar em temperatura ambiente, sobre lamínulas, sendo montada em lâminas com a resina Naphrax (Battarbee, 1986).

As observações foram realizadas sob aumento de 1.000x, a partir de transectos ortogonais na linha mediana da lamínula. Optou-se pela contagem de valvas e não de frústulas, porque o processo de oxidação tende a separar as valvas das diatomáceas. Das valvas fragmentadas foram consideradas apenas as que possuem dimensões superiores a 50% do total.

O número de transectos examinados esteve relacionado à quantidade de valvas observadas em cada sub-amostra. Embora a literatura indique a necessidade de se quantificar cerca de 400 valvas (Lund *et al.*, 1958; Stockner & Benson, 1967; Battarbee, 1986), observando-se as distribuições de frequência dos táxons nas diversas profundidades do testemunho analisado, plotados num eixo cartesiano com amostras de tamanho progressivo, estas forneceram curvas ascendentes estabilizadas entre 1.000 e 2.000 valvas contadas. Estes valores foram obtidos, em média, contando-se um ou dois transectos medianos ortogonais por lâmina. Em certas situações, até sete transectos por lâmina foram examinados para obtenção de contagens significativas.

Para o cálculo da densidade valvar, empregou-se a seguinte fórmula (Battarbee, 1986):

$$N = (NT \times AL / T \times AT) / V$$

onde:

N = Densidade total de valvas por cm<sup>3</sup>

NT = soma do número de valvas efetivamente contadas em todos os transectos

AL = área total da lamínula de 24x32mm (768mm<sup>2</sup>)

V = volume da amostra, que foi constante (0,2ml) para a alíquota estudada

T = número de transectos verticais contados

AT = área do transecto (2,232mm<sup>2</sup> para lamínulas de 24x32mm em aumento de 1.000x no microscópio utilizado para o estudo).

## 2. Câmaras de sedimentação

Foi utilizada uma alíquota de 1,0 ml do volume oxidado reconstituído, transferida para um erlenmeyer e complementada com água destilada até 10 ml. A diluição foi duplicada pela adição de mais 10 ml de água destilada, após o que retirou-se 2 ml para sedimentar por 2 horas.

A contagem do número de valvas foi feita com auxílio de microscópio invertido (Utermöhl, 1958) a partir da sedimentação de alíquotas de 1ml (correspondente a 0,05cm<sup>3</sup>) diluídas em cubetas de 2ml de capacidade, por 2 horas. A quantificação foi feita contando-se, na maior parte das vezes, 25 campos alternados em dois transectos ortogonais medianos, usando aumento de 400x. Para calcular o número absoluto de valvas foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{ml contado} = (\text{Sob} (\mu\text{m}^2) \times h (\text{mm}) \times \text{NCC}) / 1.000.000$$

onde:

Sob = área do campo, que foi constante (232.427,6μm<sup>2</sup>) para o microscópio utilizado, consideradas a objetiva de 40x e a ocular de 10x.

h = altura da câmara de contagem (5mm para a câmara de 2ml).

NCC = número de campos efetivamente contados nos dois transectos.

## Processamento das Informações

Aos valores foram aplicadas análises não-paramétricas para duas amostras independentes através dos softwares BioEstat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000) e Estatística para Windows 4.2 (1993). Inicialmente testou-se a hipótese de não haver concordância entre as duas contagens através das análises de correlação de Kendall (Γ=0) e de Spearman (r<sup>2</sup>=0).

H<sub>0</sub> = não há concordância nos resultados obtidos nas contagens em lâminas e em câmaras

H<sub>1</sub> = há concordância nos resultados obtidos pelos dois métodos

Nível de significância: α = 0.05

Em seguida, aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov (Siegel, 1977, modificado por Centeno, 1999), com dados mensurados a nível intervalar retirados da mesma população. Neste caso, testou-se a hipótese de que os resultados de contagem independem do método escolhido:

H<sub>0</sub> = os resultados independem do método utilizado ser em lâminas ou em câmaras

H<sub>1</sub> = os resultados dependem do método escolhido

Nível de significância: α = 0.05

## Resultados e discussão

A variação dos valores absolutos obtidos nas contagens em ambos os métodos (Tab: I, Fig. 1) apontou a presença de um valor discrepante (*outlier*) na contagem em câmara da sub-amostra na profundidade de 1,8m ( $19,3 \times 10^6$  valvas.cm<sup>-3</sup>). Este valor não foi desprezado nas análises subsequentes, uma vez que, aparentemente, pouco interferiu nos parâmetros amostrais de média e mediana (Fig. 2).

Tabela I: Parâmetros amostrais verificados nas contagens por ambos os métodos comparados.

Método	Amplitude (valvas.cm <sup>-3</sup> )	Mediana (me)	Média (x)	Desvio padrão (s)	Variância (s <sup>2</sup> )
Lâminas	0 - $9,2 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$3,5 \times 10^{12}$
Câmaras	0 - $19,3 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$	$7,7 \times 10^{12}$

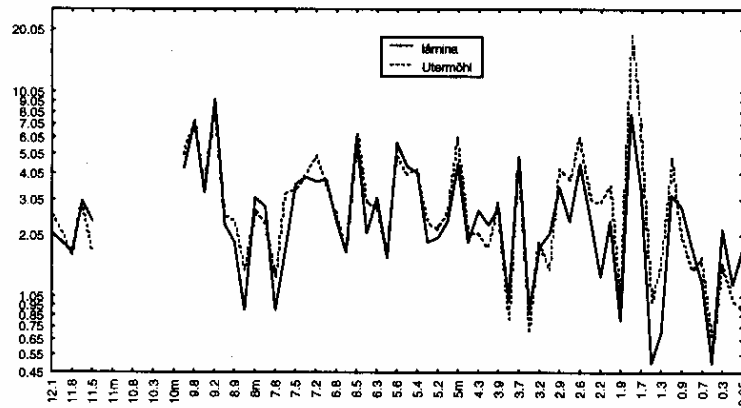


Figura 1: Comparação entre os valores de densidade valvar obtidos a partir de contagens em lâminas e pelo método de Utermöhi (número de valvas  $\times 10^6$ .cm<sup>-3</sup>), nas 69 profundidades amostradas (em metros).

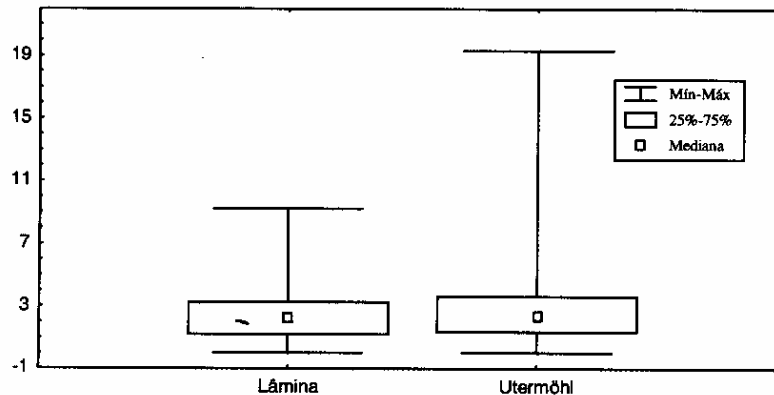


Figura 2: Amplitude de variação da densidade valvar obtida nas contagens em lâminas e em câmaras de sedimentação (Utermöhi).

A análise de correlação de Spearman das duas amostras demonstrou uma correlação linear positiva ( $r^2 = 0,93$  para  $p < 0,05$ ), confirmando os resultados do Coeficiente de Correlação de Kendall ( $T = 0,8138$  para  $p = 0,001$ ), tendo havido concordância dos dois métodos em relação aos valores obtidos nas 69 profundidades, desprezando-se a hipótese nula e aceitando-se a alternativa.

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi realizado com base em 7 classes de frequência, seguindo recomendação do *software* (BioEstat 2,0). Obteve-se uma diferença entre as duas amostras pouco significativa ( $p = 0,9437$  para GL 2), aceitando-se a hipótese de nulidade - não há diferenças entre os dois métodos.

---

## Conclusões

Valores obtidos a partir de contagens realizadas em câmara de sedimentação podem ser utilizados sempre que for necessário correlacionar a densidade valvar absoluta a qualquer outro fator físico, biológico ou químico. Os valores obtidos a partir das contagens realizadas em lâminas permanentes, que permitem maior nível de detalhamento taxonômico, podem ser empregados em termos de densidade valvar, absoluta ou relativa, nas análises de estrutura de comunidades, como nos cálculos de índices ecológicos, por exemplo.

---

## Agradecimentos

À Seção de Ficologia do Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente de São Paulo, pelo uso de suas instalações. Ao Dr. Eduardo Lobo Alcayaga, da Universidade de Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, pelas revisões críticas da análise estatística e valiosas sugestões na escolha dos testes.

---

## Referências citadas

- Ayres, M. et al. 2000. BioEstat 2.0 : aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Soc. Civil Mamirauá/ CNPq, Brasília.
- Battarbee, R.W. 1973. A new method for the estimation of absolute microfossil numbers, with reference specially to diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, 18:647-52.
- Battarbee, R.W. 1986. Diatom Analysis. In: Berglund, B.E. (ed.) *Handbook of Holocene Palaeoecology and Palaeohydrology*. John Wiley & Sons, New York. p.527-70.
- Bradbury, J.P. 1973. Ecology of freshwater diatoms. *Nova Hedwigia*, 24:145-68.
- Centeno, A.J. 1999. Curso de estatística aplicada à biologia. 2.ed. Ed. UFG, Goiânia.
- Lund, J.W.G., Kipling, C. & Le Cren, E.D. 1958. The inverted microscope method for estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia.*, 11:143-70.
- Moro, R.S. & Bicudo, C.E.M. 1998. Flutuações climáticas no Pleistoceno e Holoceno na Lagoa Dourada, Estado de Paraná, Brasil. *Acta Limnol. Bras.*, 10:47-58.
- STATISTICA para Windows. 1993. Versão 4.2. StatSoft Inc. (registrado no Departamento de Botânica da UFPR).
- Stockner, J.G. & Benson, W.W. 1967. The succession of diatom assemblages in the recent sediments of Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.*, 12:513-32.
- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Int.Ver. Theor. Angew. Limnol.*, 9:1-38.

Recebido em: 01 / 08 / 2001

Aprovado em: 04 / 01 / 2002