Validação do método de Sedgwick-Rafter para a quantificação do fitoplâncton

Sedgwick-Rafter method validation for quantification of phytoplankton

Carla Cristine Muller (*)

Mestre em Ecologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Bióloga da Companhia Riograndense de Saneamento CORSAN.

Luiz Fernando Cybis

Doutor em Engenharia Sanitária e Ambiental pela The University of Leeds, Inglaterra. Professor, orientador, pesquisador e consultor do Instituto de Pesquisas Hidráulicas (IPH) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Maria Teresa Raya-Rodriguez

Doutora em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos. Química e professora associada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Endereço para correspondência (*):

Companhia Riograndense de Saneamento – Departamento de Ensaios e Apoio Laboratorial – Av. Antônio de Carvalho, 2667 – CEP: 91430-001 – Porto Alegre – RS – Tel: (51) 3215-5760 – email: ccmuller@terra.com.br

Data de Entrada: 25/10/2010 Data de Aprovação: 21/02/2010

RESUMO

A degradação dos ambientes aquáticos altera a comunidade biótica. O fitoplâncton responde rapidamente a essas alterações. Por exemplo, as cianobactérias predominam em ambientes eutrofizados. Quando o manancial é utilizado para abastecimento público, gera dificuldades no tratamento da água na remoção de sabor, odor e cianotoxinas. Monitoramentos para avaliar e quantificar a comunidade fitoplanctônica devem utilizar métodos confiáveis. Um dos métodos normalizados é o de Sedgwick-Rafter utilizando amostras preservadas. O objetivo deste trabalho foi validar o método de Sedgwick-Rafter com amostras não preservadas. Realizou-se um estudo de validação envolvendo estabilidade, exatidão, precisão, robustez, limites de detecção e quantificação do método, Z-score e incerteza de medição. O método foi validado e considerado adequado à finalidade proposta na rotina laboratorial.

ABSTRACT

The degradation of aquatic environments alters biotic community. Phytoplankton respond quickly to these changes. For example, cyanobacteria dominates in eutrophic environments. When a water source is used for public supply, creates difficulties in water treatment in removing taste, odor and cyanotoxins. Monitoring to assess and quantify the phytoplankton community should use reliable methods. One of the standard methods is the Sedgwick-Rafter using preserved samples. The aim of this study was to validate the Sedgwick-Rafter method with unpreserved samples.

A validation study was conducted involving stability, accuracy, precision, robustness, limits of detection and quantification of the method, Z-score and measurement uncertainty. The method was validated and deemed appropriate for the proposed purpose for routine monitoring.

Palavras-chave: validação; fitoplâncton; qualidade analítica; método de Sedgwick-Rafter

Keywords: validation; phytoplankton; analytical quality; Sedgwick-Rafter method

1 INTRODUÇÃO

O aumento da concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, nos ecossistemas aquáticos, tem como consequência o aumento de sua produtividade e caracteriza-se como processo de eutrofização (ESTEVES, 1998). Dentre as mudanças nas comunidades aquáticas, uma rápida resposta à eutrofização é dada pela comunidade fitoplanctônica que passa a apresentar uma redução na diversidade de espécies, porém, com aumento considerável da biomassa das espécies presentes. Nesses ambientes, tem sido observado um aumento da dominância de espécies de cianobactérias, principalmente próximo aos centros urbanos. A ocorrência de florações nos ambientes eutrofizados é uma das características mais evidentes desse processo e ocorrem com maior frequência nos meses mais quentes do ano (ESTEVES, 1998; XAVIER, et al, 2005).

Em função da eutrofização, muitos lagos em todo o mundo já se encontram seriamente afetados. Reservatórios e rios também estão ameaçados. Esses ambientes perdem sua qualidade cênica, seu potencial recreacional e, de forma geral, seu valor econômico, tanto para o uso no abastecimento público, quanto para o uso industrial (XAVIER, et al, 2005).

O monitoramento dos grupos fitoplanctônicos é importante para garantir a qualidade da água para abastecimento público. A eutrofização interfere na qualidade da água, provocando consequências sanitárias. Dentre elas podemos destacar a obstrução de filtros em estações de tratamento de água (ETAs), aumento dos custos com produtos químicos para o tratamento da água, coloração, sabor e odor desagradáveis nas águas de abastecimento, variação frequente de pH e incorporação de novas etapas à sequência de tratamento. No entanto, o principal problema sanitário e que acarreta dificuldades no tratamento é a toxicidade de certas espécies de cianobactérias capazes de liberar compostos potencialmente tóxicos na água (BRANCO, 1986; DI BERNARDO, 1995; CARNEIRO; PEGORINI; ANDREOLI, 2005).

A análise do fitoplâncton pode ser realizada por diversos métodos descritos na literatura. Para a quantificação do fitoplâncton há métodos microscópicos (BRANCO, 1986; LAWTON et al, 1999; ASTM, 2004; APHA; AWWA; WEF,

2005; CETESB, 2005; CEN, 2006; EPA, 2007; LEGRESLEY; MCDERMOTT, 2010; EDLER; ELBRÄCHTER, 2010) e métodos moleculares (GALLUZZI; PENNA, 2010; GESCHER; METFIES; MEDLIN, 2010; MARRIN III; SCHOLIN, 2010; DIERCKS; METFIES; MEDLIN, 2010). Além destes, há métodos que utilizam fluorescência (BEUTLER et al., 2002; LEBOULANGER et al., 2002; GREGOR; MARŠÁLEK, 2004; GREGOR et al., 2005) e contagem de partículas (SIERACKI; SIERACKI; YENTSCH, 1998; DUBELAAR et al., 1999; DUBELAAR; GERRITZEN, 2000; OLSON; SHALAPYONOK; SOSIK, 2003; SOSIK et al., 2003; SOSIK; OLSON, 2007; THYSSEN et al., 2008).

Os métodos através de microscopia óptica são os mais utilizados, destacando-se o método de Sedgwick-Rafter (S-R) e o de Utermöhl. O método de S-R utiliza câmaras de contagem que recebem o mesmo nome, com capacidade para 1 mL, amostras preservadas, concentradas por filtração, sedimentação ou centrifugação e microscópio comum (APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005). É um método de baixo custo, pois não há necessidade de microscópio específico e fornece os resultados em curto período de tempo, quando comparado com o método de Utermöhl (EDLER; ELBRÄCHTER, 2010). Isso é possível, uma vez que o tempo de sedimentação das câmaras de contagem é de 15 minutos e a concentração pode ser realizada em 20 minutos por centrifugação (APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005). Para garantir eficiente monitoramento do fitoplâncton, principalmente, em mananciais utilizados para abastecimento público, os métodos de contagem devem fornecer resultados precisos, exatos e confiáveis.

De acordo com a NBR ISO/IEC 17025, “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” (ABNT, 2005), os laboratórios que pretendem ser reconhecidos como capacitados tecnicamente para realizar ensaios específicos, devem garantir a confiabilidade analítica dos ensaios realizados. O resultado de uma medição é, em geral, uma estimativa do valor do objeto de medição. Desta forma, a apresentação do resultado é completa somente quando acompanhada por uma quantidade que declara sua incerteza, ou seja, a dúvida ainda existente no processo de medição. Do ponto de vista técnico, quando realiza-se uma medição, espera-se que ela tenha exatidão (mais próxima do valor verdadeiro) e que apresente características de repetitividade (concordância entre os resultados de medições sucessivas efetuadas sob as mesmas condições) e reprodutibilidade (concordância entre os resultados das medições efetuadas sob condições variadas) (RMRS, 2003).

Nesse contexto, os ensaios realizados devem ser executados de acordo com métodos normalizados, publicados em normas internacionais, regionais ou nacionais, por organizações técnicas respeitáveis, em textos ou jornais científicos relevantes. Podem também ser usados métodos desenvolvidos ou adotados pelo laboratório de análise, se forem apropriados para o uso e se estiverem validados. Uma vez escolhido o método de ensaio, o laboratório deverá validar seu método, se este for realizado através de método normalizado utilizado fora do escopo para o qual foi concebido ou ampliações e modificações de métodos normalizados (ABNT, 2005). O processo de validação é a garantia experimental de que o método é adequado à finalidade proposta, assegurando a confiabilidade dos resultados (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009). De acordo com Bruce, Minkkinen e

Riekkola (1998), esse processo pode ser realizado através de checagens básicas ou testes trabalhosos, dependendo do propósito do método a ser validado e do nível de qualidade associado.

Assim, os passos necessários para a Validação de Métodos Laboratoriais incluem o estudo dos seguintes parâmetros, quando aplicáveis, requeridos como evidência objetiva da validação do método analítico: especificidade e seletividade, estabilidade, sensibilidade, faixa de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação, linearidade, precisão, exatidão, incerteza de medição e robustez (BRUCE; MINKKINEN; RIEKKOLA, 1998; ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009; INMETRO, 2010).

Para a validação do método de contagem do fitoplâncton são aplicáveis os estudos dos parâmetros descritos a seguir, de acordo com Bruce, Minkkinen e Reikkola (1998), INMETRO (2010) e Albano e Raya-Rodriguez (2009):

- a) Estabilidade: variação do analito ao longo do tempo como resposta às condições de armazenamento, manuseio e análise;
- b) Exatidão: grau de concordância entre resultado e valor aceito como verdadeiro;
- c) Precisão: concordância entre vários valores experimentais obtidos. Expressa por desvio padrão, coeficiente de variação ou repetitividade (REPE) (condições iguais) e reprodutibilidade (REPRO) (condições variadas);
- d) Robustez: suscetibilidade do método em responder a pequenas alterações das condições experimentais;
- e) Z-score (abordagem interlaboratorial): amplamente utilizado em Ensaios de Proficiência por Comparações Interlaboratoriais com o objetivo de avaliar o desempenho dos laboratórios participantes como satisfatório, questionável e insatisfatório;
- f) Limite de detecção do método (LDM) e limite de quantificação do método (LQM): LDM é a concentração mínima, maior do que zero, com 95 a 99% de confiança e LQM é a menor concentração determinada com exatidão e precisão aceitáveis;
- g) Incerteza de medição: dispersão dos valores atribuídos a um mensurado, considerando todos os fatores significativos de influência no ensaio.

Com o objetivo de validar o método de Sedgwick-Rafter para quantificação do fitoplâncton, utilizando amostras não preservadas, foi realizado um estudo de validação, conforme resultados apresentados neste trabalho. A utilização de amostras vivas favorece a correta identificação dos organismos (CETESB, 2005), não gera resíduos laboratoriais pelo uso de preservantes e representa economia de tempo e de custo de análise.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Conforme preconiza a NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005a), a validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. Há necessidade de validação do ensaio de fitoplâncton, pois o método normalizado de referência (APHA; AWWA; WEF, 2005) é utilizado com modificação. Neste, as amostras devem ser preservadas com, por exemplo, solução de Lugol. No entanto, o método a ser validado utiliza amostras sem preservante algum. Os parâmetros

estudados para a validação do método estão descritos abaixo.

2.1 Estabilidade

O estudo da estabilidade seguiu as orientações de Albano e Raya-Rodriguez (2009). A avaliação do tipo de preservação foi realizada através da comparação entre 10 conjuntos de amostras, cada um composto por amostra preservada com Lugol (APHA; AWWA; WEF, 2005) e amostra viva (isto é, sem nenhuma preservação), analisadas em duplicata, ao longo do tempo de armazenamento (imediatamente após a coleta e 1, 2, 3, 4 e 7 dias após a coleta) sob refrigeração. O tipo de armazenamento foi avaliado comparando 10 conjuntos de amostras, cada um composto por amostra viva mantida sem refrigeração durante 3 dias antes da análise e amostra viva armazenada sob refrigeração até a análise. As amostras foram analisadas, em duplicata, nos seguintes tempos: 3, 4 e 7 dias após a coleta. Os dados foram transformados em log10 e analisados estatisticamente através de análise de variância, utilizando o software Microsoft Excel, com nível de significância de 95%.

2.2 Exatidão

A comparação entre o método que se quer validar e o método normalizado foi realizada com a colaboração da Divisão de Pesquisa do Departamento Municipal de Água e Esgoto do município de Porto Alegre (DVP-DMAE). O Laboratório de Hidrobiologia da DVP-DMAE utiliza o método de Sedgwick-Rafter de acordo com APHA, AWWA e WEF (2005). A mesma amostra foi analisada pelos dois laboratórios, sendo realizadas 7 replicatas por cada um. Os resultados foram transformados em log10 e analisados pelo Teste-t para variâncias equivalentes com 95% de confiança, através do software Microsoft Excel (ALBANO; RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

2.3 Precisão

O estudo da precisão do método foi baseado na Repetitividade (REPE) e na Reprodutibilidade (REPRO), realizado seguindo o Estudo Formal de Repetitividade e Reprodutibilidade proposto por Albano e Raya-Rodriguez (2009). Foram avaliados dois analistas, realizando a contagem de 20 amostras, em triplicata e em curto intervalo de tempo entre elas. Os dados foram transformados em log10 e analisados estatisticamente, obtendo-se o desvio da REPE (REPE), o desvio da REPRO (REPRO) e o desvio de REPE e REPRO (R&R(%)). Para detalhes dos cálculos, consultar Albano e Raya-Rodriguez (2009).

2.4 Robustez

Para o estudo da robustez foram avaliados três fatores que poderiam causar pequenas interferências no método, sendo frasco de coleta (polietileno não coberto por papel alumínio e polietileno coberto por papel alumínio), microscópio (equipamento 1 – Olympus BX50 – e equipamento 2 – Olympus BX51) e tempo até a análise (imediatamente após a coleta e 3 dias após a coleta). Segundo a metodologia de Albano e Raya-Rodriguez (2009), foram analisadas 6 replicatas de cada uma das combinações entre os três fatores, totalizando 8 combinações. Para cada fator foi calculada uma diferença entre as combinações. A média das diferenças elevadas ao quadrado (M) foi utilizada para o cálculo do desvio da robustez (σ_{ROB}) (Equação 1).

$$\sigma_{ROB} = \sqrt{2 \times M} \quad (\text{Equação 1})$$

O método é considerado robusto se σ_{ROB} for menor do que o desvio da REPRO (σ_{REPRO}).

2.5 Z-score (abordagem interlaboratorial)

O método de contagem do fitoplâncton em processo de validação foi utilizado na participação do Programa Piloto de Ensaio de Proficiência em Cianobactérias promovido pela Rede Metrológica do Rio Grande do Sul (RMRS), ocorrido em maio de 2010 (MÜLLER; RAYA-RODRIGUEZ; CYBIS, 2010). O Programa consistiu na identificação e contagem de cianobactérias. Foram recebidas amostra viva (1L) e amostra preservada com solução de Lugol (1L). Os métodos de contagem recomendam que seja utilizada amostra preservada para a quantificação, o que também foi recomendado pela RMRS. No entanto, com o objetivo de validar o método, a quantificação foi realizada com a amostra viva. Os resultados foram enviados à RMRS para cálculo do desempenho dos laboratórios participantes (Z-score). Quanto mais próximo de zero for o Z-score, mais próximo do valor alvo estará a resposta analítica do laboratório.

2.6 Limite de Detecção do Método (LDM)

Baseado no LDM teórico de 3 céls./mL, de acordo com a distribuição de Poisson (ISO/TR, 2001), foi selecionada uma amostra com baixa densidade celular, porém, acima no limite referido, para realização do cálculo do LDM. O LDM foi calculado seguindo Albano e Raya-Rodriguez (2009). Foram analisadas 7 replicatas da amostra selecionada e calculada a média ($\bar{x}$) e o desvio padrão (σ) das contagens. Todos os cálculos foram realizados com os dados transformados em log10. O LDM foi calculado pela Equação 2:

$$LDM = (t \times \sigma) + \bar{x} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo t o valor de t-Student para 95% de confiança e para 6 graus de liberdade (n° de replicatas – 1).

2.7 Limite de Quantificação do Método (LQM)

Utilizando os mesmos dados das contagens realizadas para o cálculo do LDM, o LQM foi calculado, seguindo Albano e Raya-Rodriguez (2009), pela Equação 3:

$$LQM = \bar{x} + (10 \times \sigma) \quad (\text{Equação 3})$$

2.8 Incerteza de Medição

O cálculo da incerteza de medição (IM) da contagem do fitoplâncton foi realizado segundo CALA (2010) e Albano e Raya-Rodriguez (2009). Os desvios de REPE e REPRO foram os componentes de incerteza considerados no cálculo da IM e foram obtidos conforme item 2.3 Precisão. Cada desvio foi utilizado para o cálculo do Desvio Padrão Relativo (RSD) e das Incertezas Padrão (IP), conforme Equação 4.

$$IP(\%) = RSD \times 100 = ((\text{média das contagens})) \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo RSD o desvio padrão relativo calculado para cada componente de incerteza, isto é, REPE e REPRO, e σ corresponde a σ_{REPE} e σ_{REPRO} . A incerteza combinada da REPE e da REPRO (IC) e a incerteza expandida (IE), foram calculadas seguindo CALA (2010) através da Equação 5 e da Equação 6, respectivamente. k é o fator de abrangência para 95,45% de probabilidade (ABNT/INMETRO, 2003) obtido em função do grau de liberdade efetivo.

$$IC = \sqrt{(RSD_{REPRO})^2 + (RSD_{REPE})^2} \quad (\text{Equação 5})$$

$$IE = IC \times k \quad (\text{Equação 6})$$

3 RESULTADOS

As amostras utilizadas para avaliação da estabilidade foram coletadas em diferentes locais, como lagos de praças da cidade de Porto Alegre e estação de tratamento de esgotos, compreendendo diferentes densidades e composições de organismos fitoplanctônicos, conforme Tabela 1. Cada conjunto de amostras (preservada e viva / refrigerada e não refrigerada) foi submetido à Análise de Variância (ANOVA) e para todas elas o $F_{\text{calculado}}$ foi menor do que o F_{tabelado} , com 95% de confiança, ou seja, não há diferença significativa entre os resultados das contagens das amostras viva e preservada / refrigerada e não refrigerada quando analisadas até 3 dias após a coleta. Posterior a esse tempo, ocorreu declínio da comunidade fitoplanctônica da amostra viva em relação à preservada e da amostra não refrigerada em relação à refrigerada.

Tabela 1. Grupos fitoplanctônicos predominantes e densidade fitoplanctônica inicial das amostras analisadas no estudo da estabilidade.

Amostra	Condição avaliada	Grupos predominantes	Densidade fitoplanctônica inicial (cél.s.mL ⁻¹)	
			A	B
1	Preservação	Cloro	3,0x10 ³	3,3x10 ³
2	Preservação	Cloro e Ciano	8,7x10 ⁴	8,5x10 ⁴
3	Preservação	Ciano	4,6x10 ⁴	4,6x10 ⁴
4	Preservação	Cloro	1,7x10 ⁴	1,7x10 ⁴
5	Preservação	Cloro	3,8x10 ⁴	3,5x10 ⁴
6	Preservação	Cloro	5,1x10 ³	5,6x10 ³
7	Preservação	Cloro	8,4x10 ³	8,0x10 ³
8	Preservação	Cloro	5,5x10 ³	5,3x10 ³
9	Preservação	Cloro e Ciano	1,3x10 ⁵	1,4x10 ⁵
10	Preservação	Cloro	6,1x10 ³	5,7x10 ³
1	Armazenamento	Cloro	3,5x10 ³	3,2x10 ³
2	Armazenamento	Cloro	9,3x10 ³	1,1x10 ⁴
3	Armazenamento	Cloro e Ciano	1,1x10 ⁵	1,1x10 ⁵
4	Armazenamento	Cloro	4,9x10 ⁴	4,4x10 ⁴
5	Armazenamento	Cloro	4,7x10 ³	4,6x10 ³
6	Armazenamento	Cloro e Diatom	8,3x10 ³	8,4x10 ³
7	Armazenamento	Cloro	1,5x10 ⁴	1,6x10 ⁴
8	Armazenamento	Cloro e Ciano	1,5x10 ⁵	1,7x10 ⁵
9	Armazenamento	Cloro e Diatom	1,3x10 ⁴	1,1x10 ⁴
10	Armazenamento	Cloro	1,3x10 ⁴	1,2x10 ⁴

Cloro = Clorofíceas; Ciano = Cianobactérias; Diatom = Diatomáceas

A corresponde à amostra viva quando avaliada a condição preservação e à amostra não refrigerada quando avaliada a condição armazenamento.

B corresponde à amostra preservada quando avaliada a condição preservação e à amostra refrigerada quando avaliada a condição armazenamento.

A Tabela 2 apresenta os resultados das replicatas do estudo da exatidão. O resultado do Teste-t mostrou que os métodos são semelhantes entre si, pois $t_{\text{calculado}}$ foi menor do que o t_{tabelado} para 95% de confiança.

Tabela 2. Resultados das replicatas do estudo da exatidão comparando os métodos de Sedgwick-Rafter validado e normalizado.

Réplicas	Método validado (cél.s.mL ⁻¹)	Método normalizado (cél.s.mL ⁻¹)
1	3,9x10 ³	4,6 x10 ³
2	3,8 x10 ³	4,0 x10 ³
3	3,8 x10 ³	4,9 x10 ³
4	3,6 x10 ³	3,4 x10 ³
5	3,8 x10 ³	4,6 x10 ³
6	3,6 x10 ³	3,7 x10 ³
7	3,0 x10 ³	3,9 x10 ³

A metodologia utilizada para o estudo da precisão permitiu decompor a parcela da variabilidade referente a REPE e a REPRO, identificando as maiores contribuições para as possíveis variações do ensaio. O desvio de REPE foi 0,066, em $\log_{10}$, e o desvio de REPRO foi 0,027, em $\log_{10}$, mostrando que a REPE é a parcela que implica maior variação para o ensaio, contribuindo com 85%. O desvio R&R, que faz a avaliação da variabilidade total associada ao ensaio, foi de 9%, ficando dentro da faixa de aceitação proposta por AIAG (2002), ou seja, considerado Aceitável, uma vez que R&R (%) foi menor do que 10%. A Tabela 3 apresenta os resultados das amostras, transformados em $\log_{10}$, utilizados para o cálculo da precisão. A combinação dos três fatores avaliados no estudo da robustez (equipamento, frasco de coleta e tempo de análise) (Tabela 4) não influenciou o resultado final do ensaio. O desvio da robustez (0,023) foi menor do que o desvio da REPRO intralaboratorial (0,027), portanto, o método é considerado robusto.

De acordo com o Z-score obtido pelo laboratório, ao participar do Programa Piloto da RMRS, enviando resultados de análise da amostra viva, o desempenho foi considerado Satisfatório ($|Z| = 0,23$). Assim, confirma-se, mais uma vez, que não há diferença significativa entre os resultados de análise de amostras preservadas e amostras sem preservação. O LDM calculado para a contagem de fitoplâncton foi 18 cél.s.mL⁻¹ e o LQM foi 58 cél.s.mL⁻¹. O percentual de IM, para resultados em $\log_{10}$ (Tabela 3), foi de 4%, sendo a incerteza expandida igual a 0,045, em $\log_{10}$, com k igual a 2,03 para 95,45% de abrangência. No entanto, a expressão da IM junto com o resultado do ensaio deverá ser em intervalo, pois é melhor compreendida quando expressada na mesma unidade do resultado. Assim, como exemplo de resultado, é expresso [568 cél.s.mL⁻¹ (428-754 cél.s.mL⁻¹)].

Tabela 3. Resultados das amostras do estudo da precisão, em $\log_{10}$.

Amostra	Analista 1			Analista 2		
	Via 1*	Via 2*	Via 3*	Via 1*	Via 2*	Via 3*
1	3,91	3,94	3,92	3,80	3,77	3,75
2	4,11	4,14	4,13	4,03	3,97	4,04
3	3,98	3,99	4,02	3,93	3,98	4,03
4	3,72	3,72	3,72	3,64	3,66	3,66
5	3,75	3,82	3,73	3,57	3,56	3,58
6	4,64	4,63	4,64	4,60	4,59	4,60
7	2,46	2,42	2,44	2,38	2,35	2,31
8	2,51	2,32	2,59	2,43	2,36	2,49
9	2,60	2,66	2,67	2,66	2,51	2,56
10	1,95	2,21	1,91	1,85	1,89	1,91
11	2,36	2,28	2,36	2,36	2,22	2,33
12	3,23	3,13	3,23	3,07	3,14	3,35
13	3,40	3,34	3,46	3,36	3,32	3,38
14	2,24	2,36	2,32	2,39	2,44	2,35
15	2,17	2,18	2,36	2,11	2,21	2,11
16	4,32	4,20	4,32	4,22	4,17	4,17
17	4,30	4,30	4,03	4,28	4,17	4,11
18	3,12	3,29	3,28	3,19	3,30	3,30
19	3,34	3,44	3,43	3,41	3,44	3,45
20	2,96	2,90	3,29	2,97	2,96	3,14

* Via 1, Via 2 e Via 3 correspondem às triplicatas analisadas de cada amostra.

Tabela 4. Resultados das replicatas do estudo da robustez avaliando a interferência dos fatores equipamento, frasco de coleta e tempo decorrido da coleta até a análise.

Réplicas	Resultados em cél.s.mL^{-1} das 8 combinações transformados em $\log_{10}$							
	I-M1-C	I-M1-E	I-M2-C	I-M2-E	3-M1-C	3-M1-E	3-M2-C	3-M2-E
1	3,08	3,18	3,05	3,07	3,11	3,02	3,20	3,20
2	3,16	3,08	3,03	3,16	3,12	3,05	3,11	3,15
3	3,22	3,06	3,08	3,16	3,29	3,16	3,11	3,08
4	3,22	3,11	3,02	3,05	3,20	3,15	3,29	3,19
5	3,14	3,26	3,25	3,06	3,20	3,08	3,11	3,17
6	3,11	3,14	3,15	3,18	3,09	3,14	2,94	3,18

I corresponde à análise realizada imediatamente após a coleta; 3 corresponde à análise 3 dias após a coleta; M1 e M2 são os dois microscópios utilizados para análise; C corresponde ao frasco de coleta de polietileno sem proteção luminosa; E corresponde ao frasco de coleta de polietileno com proteção luminosa.

4 DISCUSSÃO

Os métodos de identificação e contagem de fitoplâncton que utilizam microscopia óptica, como os métodos de Sedgwick-Rafter e Utermöhl, são amplamente utilizados para a determinação da composição de espécies, biovolume e biomassa (GOSSELAIN; HAMILTON, 2000). No entanto, estes métodos consomem muito tempo e estão sujeitos a muitos erros de interpretação.

Além da necessidade de validar os métodos normalizados utilizados com modificação, conforme determina a NBR ISO/IEC 17025 (ABNT, 2005), o estudo de validação fornece informações a respeito do controle analítico do ensaio executado. Essas informações são importantes, principalmente para um método microscópico que, na sua origem, possui erros implícitos. Mesmo os métodos normalizados para a quantificação do fitoplâncton não fornecem dados de precisão, limites de detecção e quantificação, robustez e incerteza de medição, entre outros. Estes parâmetros só puderam ser conhecidos com a realização do estudo de validação.

O estudo da estabilidade mostrou que as amostras analisadas sem preservante fornecem os mesmos resultados das amostras preservadas com Lugol, desde que analisadas até 3 dias após a coleta, mantidas refrigeradas ou não refrigeradas. De acordo

com Sant'Anna et al. (2006), em caso de material vivo, o processamento da amostra deve ser realizado, preferencialmente, até 24 horas após a coleta. Além disso, para manter a viabilidade dos organismos, a amostra deve ser refrigerada para diminuir o metabolismo e o consumo de oxigênio na ausência de luz. No entanto, verificou-se declínio da densidade celular, constituindo alteração significativa da amostra, a partir de 96 horas após a coleta (dados não apresentados). Isso foi observado nas amostras armazenadas com e sem refrigeração. Sendo assim, amostras que não foram refrigeradas logo após a coleta não tem sua análise comprometida ou inviabilizada, desde que a análise ocorra em até 72 horas.

O uso de amostras vivas permite uma melhor identificação dos organismos. Os métodos de contagem recomendam, inclusive, que a análise qualitativa seja feita em amostra não preservada, pois algumas características, como mobilidade, coloração e visualização de estruturas, só podem ser observadas nos organismos vivos (APHA; AWWA; WEF, 2005; CETESB, 2005). O Lugol altera a coloração das células, rompe vesículas de ar e pode dissolver frústulas de diatomáceas mais delicadas e escamas de silicoflagelados (CETESB, 2005). Além disso, de acordo com Hawkins et al. (2005), as células de cianobactérias encolhem entre 30-40% de seu volume após preservação da amostra com solução de Lugol. Isso compromete significativamente as medições celulares

para cálculos dimensionais de área e volume ocupados, sendo preferível a utilização de amostras não preservadas para essa finalidade. No entanto, essa não é a recomendação dos métodos normalizados.

O método validado mostrou-se equivalente aos métodos normalizados. Quando comparado com o método de Sedgwick-Rafter normalizado, os resultados foram similares, conforme resultados apresentados do estudo da exatidão. A participação no programa de comparação interlaboratorial da RMRS, através da quantificação de cianobactérias, evidenciou a equivalência do método de Sedgwick-Rafter com amostras vivas aos métodos de Sedgwick-Rafter e Utermöhl normalizados. Estes últimos foram utilizados pelos participantes da rodada, sendo utilizada amostra preservada com solução de Lugol para a quantificação dos organismos (RMRS, 2010).

A reprodutibilidade dos resultados de contagem pode sofrer interferência de amostragem e sub-amostragem na retirada de alíquota para processamento e posterior análise da amostra que será avaliada. Segundo Gosselain e Hamilton (2000), as interferências podem ser a baixa contagem de células, a sedimentação não aleatória dos organismos na câmara de contagem e a presença/ausência de indivíduos coloniais e/ou filamentosos. No entanto, independente dessas interferências, o método validado mostrou-se preciso e robusto e, também, foi possível determinar o LDM e o LQM.

No estudo da precisão, os analistas avaliados possuíam graduação na área das Ciências Biológicas e receberam treinamentos específicos para a identificação e contagem do fitoplâncton. Portanto, são profissionais habilitados e atuantes na rotina de análise de amostras de mananciais superficiais. À sua disposição havia referências bibliográficas especializadas para apoio e consulta, além de materiais e equipamentos adequados à análise realizada (KARLSON et al., 2010). Tudo isso contribuiu significativamente para a alta precisão obtida (desvio de R&R igual a 9%) com amostras vivas. O treinamento e a rotina de análise são fatores que contribuem para o baixo desvio de reprodutibilidade. Comparativamente, o alto desvio de repetitividade reflete a natureza da amostra biológica viva, isto é, os organismos vivos distribuem-se de forma agregada e não formam uma solução perfeita, mas uma suspensão com variabilidade inerente (ISO, 2006).

Segundo Culverhouse et al. (2003), analistas humanos não são bons instrumentos de classificação e contagem. Estes autores relatam que a performance humana em identificar e classificar organismos ao microscópio é afetada por muitos fatores psicológicos, entre eles a capacidade de memorizar, a curto prazo, somente de 5 a 9 itens; fadiga e tédio; as constantes atualizações e modificações na taxonomia do fitoplâncton e tendência em superestimar a contagem pela expectativa prévia em encontrar determinado organismo na amostra.

Em função disso, comparando identificação e contagem de dinoflagelados marinhos entre analistas especialistas e atuantes na rotina de análise com métodos automatizados, Culverhouse et al. (2003) obtiveram uma precisão humana semelhante ao método automatizado, de 84 a 95%. Precisão menor do que 100% deve ser entendida como normal em investigações científicas. Para monitoramento de rotina, em que há grande volume de amostras

para ser processado no menor tempo possível, esse nível de precisão é aceitável e faz parte da prática laboratorial. Entretanto, utilizando o método de Utermöhl para avaliar o número mínimo de organismos que devem ser contados em uma amostra, Rott, Salmaso e Hoehn (2007) relataram uma precisão de contagem menor, de 30%. Os fatores avaliados, que poderiam interferir no resultado analítico do método, sendo frasco de coleta com e sem proteção luminosa e o microscópio utilizado na quantificação, combinados com o tempo até a análise após a coleta da amostra, não influenciaram significativamente nos resultados. Portanto, o método mostrou-se robusto.

De acordo com ISO/TR 13843 (ISO/TR, 2001), resultados de contagem seguem a distribuição de Poisson e, por isso, apresentam LDM teórico de 3 cél.mL⁻¹. Já para LeGresley e McDermott (2010), o limite de detecção do método é de 1 cél.mL⁻¹. Utilizando a metodologia de cálculo do LDM e do LQM para ensaios químicos, estes limites foram calculados para o método validado. Assim, os resultados obtidos refletem a realidade da análise, uma vez que foram obtidos experimentalmente e sob as mesmas condições analíticas. O conhecimento desses limites é mais uma maneira de garantir qualidade e confiabilidade analítica dos resultados dos ensaios. Abaixo dos limites estabelecidos, o resultado não possui grau de precisão e exatidão aceitáveis, portanto, não sendo possível expressá-lo numericamente. Portanto, os limites devem ser fornecidos junto com o resultado da amostra analisada para que o cliente possa interpretar o resultado fornecido pelo laboratório.

A incerteza está relacionada a um resultado de medição e não ao valor verdadeiro do mensurando que, na prática, não é conhecido. Ela caracteriza um intervalo ou faixa de dispersão, e não um valor pontual. Logo, a incerteza é a dúvida remanescente associada ao resultado da medição correspondendo a uma faixa de valores que podem ser atribuídos ao mensurando, não devendo ser entendida como uma “faixa de segurança” (ALBANO E RAYA-RODRIGUEZ, 2009).

De acordo com ISO/TS 19036 (ISO/TS, 2006), RMRS (2009) e Albano e Raya-Rodriguez (2009), a principal fonte de incerteza para ensaios biológicos é a REPRO intralaboratorial. Além disso, é difícil quantificar com confiabilidade a contribuição de cada passo do processo analítico, pois o analito são organismos vivos que podem estar com estado fisiológico variado, incluindo diferentes cepas, gêneros e espécies. Assim, análises biológicas não permitem rigor metrológico e a determinação da incerteza de medição requer uma abordagem de estimativa da incerteza total, não separando as fontes de incerteza de entrada individualmente (ISO/TS, 2006). Os estudos de REPE e REPRO forneceram os dados para o cálculo da IM, uma vez que eles consideram todos os fatores significativos de influência no ensaio, incluindo processos de concentração, diluição e homogeneidade das amostras. Os resultados obtidos mostraram que a REPE é uma importante fonte de incerteza, inclusive com parcela de contribuição maior do que a REPRO intralaboratorial.

5 CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitiram validar o método de Sedgwick-Rafter para a quantificação do fitoplâncton com amostras vivas. Dessa forma, cumpre-se com o exigido pela NBR ISO/IEC 17025

(ABNT, 2005), isto é, métodos normalizados utilizados com alterações ou modificações devem ser validados. O método agora validado pode ser utilizado na rotina de análises em laboratório.

Os resultados obtidos através da estabilidade, da exatidão e do Z-score mostraram não haver diferença significativa entre o uso de amostras vivas e amostras preservadas com solução de Lugol, nem entre o uso dos métodos normalizados de Sedgwick-Rafter e Utermöhl. Também através da estabilidade foi possível estabelecer um prazo de 72 horas após a coleta para a análise das amostras. Nesse período, as amostras podem ficar ou não sob refrigeração.

O método foi considerado robusto, uma vez que as variações aplicadas não alteraram significativamente os resultados. Portanto, frasco com ou sem proteção luminosa, equipamento utilizado e tempo decorrido da coleta até a análise não são fatores críticos para o ensaio quantitativo do fitoplâncton. A análise de amostra imediatamente após a coleta e 3 dias após a coleta confirma o resultado obtido no estudo da estabilidade, de que as amostras vivas podem ser analisadas até 72 horas após a coleta. O estabelecimento dos limites de detecção e quantificação do método, da precisão e, também, da incerteza de medição conferem qualidade analítica aos resultados dos ensaios. Através de um maior conhecimento do método utilizado, há possibilidade de aperfeiçoamento dos analistas e da execução das etapas do método. Tudo isso a fim de buscar melhoria contínua e garantir exatidão, precisão e confiabilidade analíticas.

6 AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Laboratório Central de Águas da Companhia Riograndense de Saneamento, em especial, Andréa dos Anjos, Aurea Giordani e Juliana Frizzo, pela compreensão e aceitação da proposta de trabalho, apoio e colaboração na execução das análises e disponibilidade da infraestrutura e equipamentos utilizados no decorrer deste estudo; ao Setor de Hidrobiologia da Divisão de Pesquisas do Departamento Municipal de Água e Esgoto de Porto Alegre, especialmente Rodrigo da Rocha Andrade, pelos estudos comparativos; à Rede Metrológica do Estado do Rio Grande do Sul, destacando Filipe de Medeiros Albano, pelos esclarecimentos em relação às análises estatísticas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Validação e Garantia da Qualidade de Ensaio Laboratoriais. Guia Prático. Porto Alegre, RS: Rede Metrológica RS, 2009. 136p.
- American Public Health Association; American Water Works Association; Water Environment Federation APHA AWWA WEF (APHA; AWWA; WEF). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21 ed. Washington, D.C., 2005.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). D4148-82: Standard Test Method for Analysis of Phytoplankton in Surface Water by the Sedgwick-Rafter Method. Estados Unidos, 2004. 3p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (ABNT; INMETRO). Guia para a Expressão da Incerteza de Medição (GUM). 3 Ed. Rio de Janeiro, 2003.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR ISO/IEC 17025: Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro, 2005.
- AUTOMOTIVE INDUSTRY ACTION GROUP (AIAG). Measurement Systems Analysis. 3. Ed. Detroit: Chrysler Corporation, Ford Motor Company and General Motors Corporation, 2002.
- BEUTLER, M. et al. A fluorometric method for the differentiation of algal populations in vivo and in situ. *Photosynthesis Research*, n. 72, p. 39-53, 2002.
- BRANCO, S. M. Hidrobiologia Aplicada à Engenharia Sanitária. 3ª Ed. São Paulo, SP: CETESB/ASCETESB, 1986. 640p.
- BRUCE, P., MINKKINEN, P., RIEKKOLA, M. L. Practical Method Validation: Validation Sufficient for an Analysis Method. *Mikrochimica Acta*, v. 128, p. 93-106. 1998.
- CANADIAN ASSOCIATION FOR LABORATORY ACCREDITATION INC. (CALA). Measurement Uncertainty Policy. P19, Revision 1.10, 2010.
- CARNEIRO, C.; PEGORINI, E. S.; ANDREOLI, C. V. Introdução. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados*. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 1. p. 25-44.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Norma Técnica L5.303: Fitoplâncton de Água Doce - Métodos Qualitativo e Quantitativo (Método de Ensaio). São Paulo, 2005.
- CULVERHOUSE, P. F. et al. Do experts make mistakes? A comparison of human and machine identification of dinoflagellates. *Marine Ecology Progress Series*, v. 247, p. 17-25, 2003.
- DIERCKS, S.; METFIES, K.; MEDLIN, L. Electrochemical detection of toxic algae with a biosensor. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.
- DI BERNARDO, L. Algas e suas Influências na Qualidade das Águas e nas Tecnologias de Tratamento. Rio de Janeiro, RJ: ABES, 1995. 140p.
- DUBELAAR, G. B. J. et al. Design and First Results of CytoBuoy: A Wireless Flow Cytometer for In Situ Analysis of Marine and Fresh Waters. *Cytometry*, v. 37, p. 247-254, 1999.
- DUBELAAR, G. B. J.; GERRITZEN, P. L. CytoBuoy: a step forward towards using flow cytometry in operational oceanography. *Scientia Marina*, v. 64, n. 2, p. 255-265, 2000.
- EDLER, L.; ELBRÄCHTER, M. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis*. UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). LG401: Standard Operating Procedure for Phytoplankton Analysis. Revision 4. Estados Unidos, 2004.
- ESTEVES, F. A. Fundamentos de Limnologia. 2ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: Interciência, 1998. 602p.
- EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION (CEN). EN 15204: Water Quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique). União Européia, 2006.

GALLUZZI, L.; PENNA, A. Quantitative PCR for detection and enumeration of phytoplankton. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

GESCHER, C.; METFIES, K.; MEDLIN, L.K. Hybridisation and microarray fluorescent detection of phytoplankton. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

GOSSELAIN, V.; HAMILTON, P. B. Algamica: revisions to a key-based computerized counting program for free-living, attached, and benthic algae. *Hydrobiologia*, v. 438, p. 139-142, 2000.

GREGOR, J. et al. In situ quantification of phytoplankton in reservoirs using a submersible spectrofluorometer. *Hydrobiologia*, n. 548, p. 141-151, 2005.

GREGOR, J.; MARŠÁLEK, B. Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. *Water Research*, v. 38, p. 517-522, 2004.

HAWKINS, P. R. et al. Change in cyanoabacterial biovolume due to preservation by Lugol's Iodine. *Harmful Algae*, v. 4, 1033-1043, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). DOQ-CGCRE-008: Orientação sobre Validação de Métodos analíticos. Revisão 03. 2010. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 19458: Water quality – Sampling for microbiological analysis. Suíça, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION / TECHNICAL REPORT (ISO/TR). ISO/TR 13843: Water quality – Guidance on validation of microbiological methods. Suíça, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION / TECHNICAL SPECIFICATION (ISO/TS). ISO/TS 19036: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines of the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Suíça, 2006.

KARLSON, B. et al. Introduction to methods for quantitative phytoplankton analysis. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. UNESCO (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris, 2010.

LAWTON, L. et al. Determination of cianobactéria in the laboratory. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Eds.) Toxic cyanobacteria in water. A guide to their public health consequences, monitoring and management. Published on behalf of WHO – World Health Organization by Taylor and Francis. London & New York, 1999. 416p.

LEBOULANGER, C. et al. Application of a submersible spectrofluorometer for rapid monitoring of freshwater cyanobacterial blooms: a case study. *Aquatic Microbial Ecology*, v. 30, p. 83-99, 2002.

LEGRESLEY, M.; MCDERMOTT, G. Counting chamber methods for quantitative phytoplankton analysis – haemocytometer, Palmer-Maloney cell and Sedgewick-Rafter cell. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. UNESCO (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), Paris, 2010.

MARRIN III, R.; SCHOLIN, C. A. Toxic algal detection using rRNA-targeted probes in a semi-automated sandwich hybridization format. In: KARLSON, B.; CUSACK, C.; BRESNAN, E. (Editors.) Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis. Paris, UNESCO. (IOC Manuals and Guides, nº 55.) (IOC/2010/MG/55), 2010.

MÜLLER, C. C.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; CYBIS, L. F. Diagnóstico da qualidade analítica na quantificação de cianobactérias. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 15, n. 3, p. 283-290, 2010.

OLSON, R. J.; SHALAPYONOK, A.; SOSIK, H. J. An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: FlowCytobot. *Deep-Sea Research – Part I*, v. 50, p. 301-315, 2003.

REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). Metrologia: A base física da qualidade. CD-ROM, Rede Metrológica do Rio Grande do Sul, 2003.

REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). RM68 – Incerteza de medição: guia prático do avaliador de laboratórios. Revisão 03. Porto Alegre, 2009.

REDE DE METROLOGIA E ENSAIOS DO RIO GRANDE DO SUL (RMRS). Relatório de 2010 – Programa Piloto de Ensaio de Proficiência em Cianobactérias. Porto Alegre, 2010.

ROTT, E.; SALMASO, N.; HOEHN, E. Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates – an easy task or a Gordian knot? *Hydrobiologia*, v. 578, p. 141-146, 2007.

SANT'ANNA, C. L. et al. Manual ilustrado para Identificação e Contagem de Cianobactérias Planctônicas de Águas Continentais Brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência; São Paulo: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2006, 58p.

SIERACKI, C. K.; SIERACKI, M. E.; YENTSCH, C. S. An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Marine Ecology Progress Series*, v. 168, p. 285-296, 1998.

SOSIK, H. M. et al. Growth rates of coastal phytoplankton from time-series measurements with a submersible flow cytometer. *Limnology and Oceanography*, v. 48, n. 5, p. 1756-1765, 2003.

SOSIK, H. M.; OLSON, R. J. Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnology and Oceanography: Methods*, v. 5, p. 204-216, 2007.

THYSSEN, M. et al. The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *Journal of Plankton Research*, v. 30, n. 3, p. 333-343, 2008.

XAVIER, C. F.; DIAS, L. N.; BRUNKOW, R. F. Eutrofização. In: ANDREOLI, C. V.; CARNEIRO, C. (Editores) Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados. Curitiba: SANEPAR/FINEP, 2005. Cap. 8. p. 271-302.