



Amostragem em Limnologia

Organizadores:
Carlos E. de M. Bicudo
Denise de C. Bicudo

Rima

MÉTODOS DE COLETA, PRESERVAÇÃO, CONTAGEM E DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA EM ZOOPLÂNCTON DE ÁGUAS EPICONTINENTAIS

RICARDO MOTTA PINTO COELHO

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento da ecologia das águas continentais, sejam elas naturais ou não, requer amplo entendimento da estrutura e funcionamento de suas principais comunidades. Dentre tais comunidades, o plâncton ainda representa um desafio aos ecólogos, pois grande parte de seus estudos ainda é de caráter descritivo, principalmente se considerarmos as regiões tropicais. O interesse pelo estudo de organismos planctônicos em águas continentais brasileiras tem sido crescente nas últimas décadas, em decorrência não só da necessidade de preservação, mas também da demanda de ecotecnologias que promovam o desenvolvimento sustentável dos inúmeros ecossistemas aquáticos existentes no País. Dessa forma, é grande o interesse pelo estudo de certos ecossistemas lacustres naturais no Brasil, principalmente aqueles na região do pantanal matogrossense, lagoas associadas a sistemas ripários, lagunas costeiras, além da província lacustre do médio rio Doce em Minas Gerais. Por outro lado, houve intenso programa governamental de construção de reservatórios. Tal política vem demandando esforço considerável da comunidade científica na busca do entendimento do funcionamento desses novos ecossistemas.

Lagos e reservatórios, independente de seu tamanho, assim como os grandes rios, são habitados por inúmeros organismos planctônicos (Margalef, 1983). Esses organismos estão na base da cadeia alimentar e, graças a seu elevado metabolismo, são capazes de influenciar processos ecológicos fundamentais, como ciclagem de nutrientes e magnitude da produção biológica. O zooplâncton é constituído de consumidores primários (herbívoros) e predadores de diferentes níveis tróficos. Em contraste com os ambientes marinhos, o zooplâncton de águas continentais é composto de poucos grupos de invertebrados aquáticos. Os principais componentes dessa comunidade são, pela ordem de tamanho, protozoários (amebas, flagelados, ciliados), vermes asquelmintos (rotíferos), microcrustáceos copépodes e cladóceros e alguns tipos de insetos, principalmente larvas de dípteros (Edmondson, 1959).

Os métodos a serem empregados no estudo do zooplâncton devem ser cuidadosamente selecionados e calibrados antes de o estudo ser efetivamente iniciado. Em razão de sua natureza, caracterizada por explorar as águas abertas, o zooplâncton é formado por organismos de concepção estrutural muito delicada. São organismos de pequeno porte: a grande maioria tem dimensões lineares máximas inferior a 1 mm (Dussart, 1965). Muitas

espécies podem ser coloniais, apresentar bainhas de gelatina delgadas ou processos longos e finos em forma de cerdas, antênulas, espinhos e esporões (Pennak, 1978). Em decorrência disso, elas passam a sofrer rápida degradação estrutural e metabólica assim que são coletadas. Dessa forma, os resultados de qualquer estudo ecológico envolvendo organismos planctônicos podem ser muito influenciados pelas características dos métodos empregados.

O zooplâncton apresenta-se distribuído de forma não homogênea em seu habitat, exibindo diferentes padrões de segregação espacial, com gradientes ou mosaicos (*patches*) em suas abundâncias tanto verticais quanto horizontais. Esses padrões apresentam multiplicidade de escalas, seja na componente espacial, seja ao longo do tempo. Muitos padrões de distribuição espacial mudam, às vezes, no decorrer de algumas horas.

2. COLETA DE ZOOPLÂNCTON

Como os organismos zooplantônicos vivem dispersos na coluna d'água, sua coleta, quase sempre, envolve concentração prévia por meio de algum tipo de filtragem. Como todo processo de amostragem, tais coletas devem ser realizadas com réplicas para que se possa oferecer estimativa da eficácia amostral. Vários métodos têm sido usados para coleta de organismos zooplantônicos. Descreveremos, a seguir, os mais comuns.

2.1 REDES DE PLÂNCTON

Esta é a forma mais antiga de coletar plâncton. As primeiras redes já estavam em operação no século XIX (De Bernardi, 1984). Há vários tipos de redes. As principais variações estão relacionadas ao diâmetro da boca de rede, à forma do cone de filtragem, à abertura de malha empregada e ao copo coletor. Trata-se de método cuja eficiência de amostragem é muito variável. O volume filtrado, normalmente, é calculado pela seguinte equação baseada no volume percorrido pela rede:

$$V_f = \pi \cdot r^2 \cdot d$$

em que:

V_f = volume filtrado;

r = raio da boca da rede;

d = distância percorrida.

Esse volume nem sempre corresponde, exatamente, ao que foi efetivamente filtrado, uma vez que as redes sofrem colmatagem de seus poros à medida que vão atravessando a coluna d'água. O grau de colmatagem pode variar de acordo com as condições do lago (presença de seston) e a forma pela qual ela é operada. Segundo Tranter & Heron (1965, 1967), as redes mais eficientes devem ser dotadas de cone redutor e a área de filtragem deve ser, aproximadamente, três vezes maior do que a área da boca da rede (Figura 9.1). Normalmente, desaconselha-se o uso de redes para amostragens qualitativas em lagos com elevada turbidez.

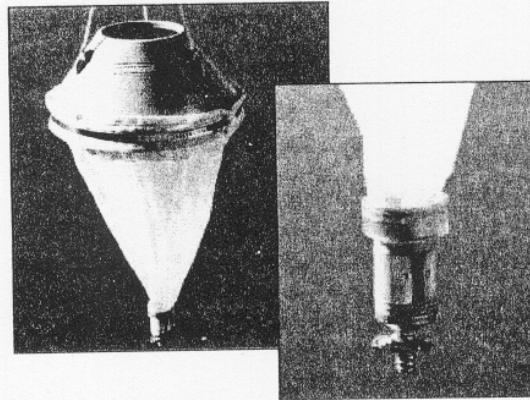


Figura 9.1 Rede com redutor cônico para coleta de zooplâncton. No detalhe, copo coletor dotado de gaze para filtragem e saída dos organismos.

O tipo de tela empregada tem efeito marcante na seletividade e eficiência da rede. As melhores redes possuem gaze de náilon do tipo monofilamento. No Brasil, tal tipo de gaze é conhecido pela marca MONYL, de procedência suíça. Esse tipo de tela também apresenta grande durabilidade e boa resistência à colmatagem, já que a uniformidade das fibras favorece sua autolimpeza durante o processo de filtragem. Telas de seda natural foram as primeiras a ser utilizadas, mas elas apresentam muitas irregularidades nas fibras e, em decorrência, os poros não são uniformes (De Bernardi, 1984).

O tamanho dos poros pode variar de 0,01 a 1 mm. Eismont-Karabin (1978) alerta, contudo, que o uso de poros muito pequenos não garante boa eficiência. Pelo contrário, redes com dimensões de poro iguais ou menores do que 20 μm não são capazes de coletar eficientemente rotíferos. Normalmente, os programas de amostragem de zooplâncton regulares devem considerar dois tamanhos distintos de poros. Para o microzooplâncton (organismos menores do que 200 μm), sugere-se uso de redes na faixa de 50-65 μm e, para organismos mesozooplancônicos (> 200 μm), sugere-se adoção de redes com poros na faixa de 120-160 μm . Essa recomendação resulta do fato de que os organismos têm diferentes dimensões lineares (ântero-posterior *versus* laterais), além de poderem se curvar e se contrair em decorrência das ondas de pressão durante a filtragem. Por exemplo, uma larva de copépode com mais de 400 μm de comprimento poderá passar através de rede de 200 μm de abertura de malha dependendo da posição e de sua reação no momento em que tocar a rede.

O copo coletor das redes é um acessório que influenciará muito a eficiência do aparato como um todo. Normalmente, ele deve ser dotado de áreas laterais forradas com a mesma rede utilizada no cone e de abertura inferior por onde serão coletados os organismos. O uso de coletores sem tais características irá impedir que organismos eventualmente aderidos ao tecido da rede sejam lavados de modo eficaz ao final do arrasto.

Normalmente, as redes obtêm maiores eficiências quando são desenhadas especificamente para o ambiente onde serão operadas. Assim, um lago eutrófico, dominado por

pequenos organismos, poderá ser convenientemente amostrado utilizando rede pequena, com diâmetro entre 20 e 40 cm e abertura de malha por volta de 70 μm , desde que os arrastos sejam relativamente pequenos para que a rede não fique colmatada. Para um lago oligotrófico, entretanto, dominado por grandes cladóceros e calanóides, recomenda-se uso de redes maiores, com diâmetro de 60 a 80 cm e abertura de malha da ordem de 200 μm .

Um dos maiores problemas relacionados ao uso das redes é que não se pode estudar seções individualizadas da coluna d'água. Isto é particularmente relevante no caso do zooplâncton que, em muitos casos, apresenta deslocamento conspícuo, ou seja, migração vertical diurna. Assim, foram desenvolvidas redes especiais dotadas de mecanismos que permitem abertura e fechamento do cone coletor em determinadas profundidades. Na maioria dos casos, esse mecanismo é acionado por mensageiros. Há dois tipos dessas redes, a de Nansen e o planctonômetro.

2.2 REDE DE NANSEN

Redes de Nansen são redes tradicionais dotadas de mecanismo de trava que, ao ser acionado por mensageiro, impede que a rede continue a filtrar. Embora seja muito fácil de operar, a rede de Nansen apresenta os mesmos inconvenientes de toda rede de plâncton, sendo o principal deles a inexistência de mecanismo medidor do volume filtrado.

2.3 PLANCTONÔMETRO

São redes de plâncton acopladas a uma seção cilíndrica de metal onde há um mecanismo de abertura e fechamento comandado por mensageiro. Na parte metálica, normalmente há um medidor de fluxo que permite determinar, com precisão, o volume efetivamente filtrado. O planctonômetro mais conhecido é o de Clarke-Bumpus (De Bernardi, 1984). Este é o equipamento preferido para amostragem de zooplâncton em grandes sistemas lacustres e em áreas oceânicas, principalmente por ser muito eficiente na coleta de organismos de médio a grande porte. Apresenta o inconveniente de ser muito pesado, sendo, normalmente, operado por guinchos elétricos ou hidráulicos fixados à embarcação.

Os planctonômetros e alguns tipos de redes podem ser utilizados em arrastos horizontais a diferentes profundidades, se o aparato for dotado de pesos ou lastros posicionados adequadamente. A embarcação deve mover-se com velocidade constante, entre 50 e 125 $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. A profundidade do arrasto pode ser medida pela seguinte fórmula:

$$P = L \cdot \cos \alpha$$

em que:

P = profundidade de arrasto;

L = distância estendida do cabo;

α = ângulo entre o cabo e a linha vertical.

O ângulo pode ser medido acuradamente com clinômetro. No entanto, é relativamente simples ajustar visualmente o ângulo de 45°, especialmente se a rede estiver sendo operada

a partir de embarcação de pequeno porte. O co-seno de 45° é 0,7. Assim, para obter a profundidade de arrasto, basta estender o cabo por uma distância igual a 1,4 m da profundidade desejada.

2.4 GARRAFAS E TUBOS AMOSTRADORES

As garrafas amostradoras são muito usadas para coleta de organismos pequenos como rotíferos e protozoários. Essas garrafas podem variar quanto à forma e ao volume, bem como quanto ao material com que são confeccionadas. Há vários tipos de garrafas, mas, atualmente, apenas dois têm sido usados com maior frequência, quais sejam: garrafa de van Dorn e garrafa de Kemmerer. Esses amostradores apresentam a vantagem de ser muito confiáveis e de fácil operação. Ambos são operados por meio de mensageiro, isto é, de uma peça metálica pesada que corre ao longo da corda que sustenta o aparelho para desarmar o mecanismo de trava das tampas. Essas garrafas podem ser de metal ou de material sintético (PVC, acrílico ou plástico). Preferem-se, normalmente, as garrafas de material sintético, por serem mais leves e práticas de operar e por não apresentarem risco de contaminação do zooplâncton no caso de estudos ecotoxicológicos. É muito importante o volume dessas garrafas. Por exemplo, em lagos eutróficos pode-se usar garrafa de pequeno volume (1 a 2 litros), mas em lagos oligotróficos são preferidas garrafas de maior volume (5 litros).

Tubos amostradores são tubos cilíndricos de acrílico ou PVC, com comprimento de 1 a 3 m e diâmetro variável de 4 a 15 cm. Normalmente, são dotados de mecanismos de fechamento similares às garrafas amostradoras, com fechamento por meio de mensageiro. Apresentam a vantagem de amostrar maior seção da coluna d'água, sendo o equipamento preferido para amostrar microzooplâncton em grandes lagos e reservatórios.

A forma de fechamento, o reduzido volume e o pequeno diâmetro da abertura tornam as garrafas amostradoras inadequadas para estudo de muitos organismos zooplânctônicos que apresentam pressorreceptores ou que possuem capacidade natatória vigorosa, como a maioria dos copépodes, alguns cladóceros e larvas de dípteros. Esses organismos seriam capazes de evadir-se antes que a garrafa fosse totalmente fechada.

As garrafas normalmente possuem mecanismo de fechamento, em que as tampas superior e inferior apresentam forte deslocamento vertical ou oblíquo quando o fechamento da garrafa é acionado pelo mensageiro. Tal mecanismo gera ondas de pressão relativamente fortes, que poderão causar danos a colônias delicadas como as de *Conochilus unicornis* ou a organismos gelatinosos como os de *Ptygura libera* e *Collotheca* sp.

2.5 BOMBAS DE SUÇÃO

Há vários tipos de bombas com diferentes capacidades e características operacionais. As mais comuns são as elétricas (12 V) ou manuais. Bombas elétricas normalmente são acopladas a motogeradores, que permitem seu uso em embarcações. A preferência tem sido as bombas elétricas, uma vez que permitem manutenção de fluxo constante. Essas bombas são acopladas a tubos flexíveis de plástico ou borracha, de 1 a 3 cm de diâmetro, que percorrem toda a coluna d'água. Os tubos devem ser lastreados, de modo a

permanecerem na posição vertical durante a sucção. Na outra extremidade do tubo são acoplados frascos ou redes coletoras com diferentes aberturas de gaze (malha).

As bombas permitem obter unidades amostrais integradas da coluna d'água de modo relativamente fácil, sendo capazes de filtrar grande volume de água em pouco tempo. Além disso, as bombas são equipamentos robustos, relativamente fáceis de operar, cuja eficiência de amostragem dependerá muito das características operacionais e da natureza do ambiente em questão. Dentre os problemas normalmente associados às bombas, um refere-se aos danos sofridos pelos organismos mais delicados no processo de filtragem e outro à seletividade relacionada à pequena abertura de diâmetro do tubo coletor. Alguns estudos recentes indicaram, contudo, que se trata de metodologia confiável, com eficiência de captura superior à das redes ou, até mesmo, de algumas armadilhas (Suzuki & Bozelli, 1998).

2.6 ARMADILHAS DE PLÂNCTON

As armadilhas de plâncton são equipamentos especialmente desenhados para coleta de organismos zooplancônicos. Normalmente, possuem certas características estruturais que têm por finalidade eliminar muitos dos inconvenientes apresentados pelos outros métodos. Uma de suas maiores vantagens refere-se à precisão do volume filtrado e ao modo de fechamento do equipamento. Apresentam a desvantagem de serem aparatos de custo relativamente elevado.

Uma das armadilhas mais conhecidas e utilizadas é a de Clarke-Juday, que possui mecanismo de fechamento horizontal que evita as ondas de pressão presentes nas garrafas amostradoras. Podem ter volume de 5 a 10 litros e dispensam uso de guinchos (usados nos planctonômetros), baterias ou geradores (no caso de bombas elétricas). A maioria dos estudos comparativos tem demonstrado que se trata de aparatos com boa eficiência de captura para a maioria dos grupos do zooplâncton de águas epicontinentais.

Schindler desenhou outro tipo de armadilha, que vem sendo muito usado. Trata-se de uma caixa de acrílico em que as dimensões verticais superam, pelo menos três vezes, as laterais, de modo a minorar o efeito do mecanismo de fechamento (oblíquo). Esse tipo de armadilha apresenta a vantagem da simplicidade de construção e da leveza (dependendo do tamanho, obviamente). Os principais tipos de armadilhas de zooplâncton estão ilustrados na Figura 9.2. Vários estudos têm demonstrado a elevada eficiência da armadilha de Schindler, especialmente para captura de copépodes e organismos de grande porte (Tabelas 9.1 e 9.2).

Tabela 9.1 Comparação da eficiência de captura de alguns aparatos de coleta de zooplâncton (Larsson, in Bottrell *et al.*, 1976).

	Armadilha de Schindler	Bomba manual	Garrafa de Ruttner
<i>Polyarthra vulgaris</i>	11,30 ± 3,11	12,75 ± 5,15	19,33 ± 4,37
<i>Bosmina longirostris</i>	1,07 ± 0,50	3,05 ± 1,12	2,40 ± 1,51
<i>Cyclops nauplii</i>	4,48 ± 0,71	2,25 ± 1,53	3,33 ± 1,51
<i>Cyclops copepoditos</i>	11,97 ± 2,50	6,50 ± 3,54	9,60 ± 4,12

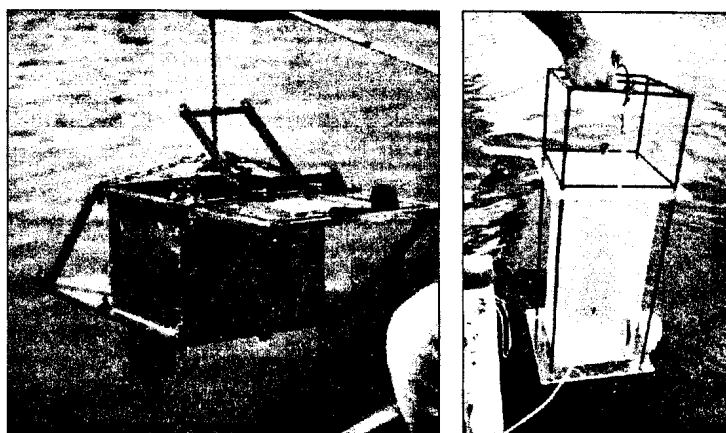


Figura 9.2 Modelos de armadilhas de coleta de zôoplâncton. À esquerda, armadilha modelo Clarke-Juday, para 5,1 litros de capacidade, construída nas oficinas do Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC-MG, em 1985. À direita, armadilha de Schindler, com 17 litros de capacidade, construída na oficina do ICB/UFMG em 1998.

Tabela 9.2 Comparação da eficiência de captura de dois tipos de armadilhas para coleta de zooplâncton em dois reservatórios distintos (Neto & Pinto-Coelho, 1999). Coletas realizadas em 1998. Volume da armadilha de Clarke-Juday = 5,1 litros; volume da armadilha de Schindler = 17,3 litros.

Organismo	Clarke-Juday	Schindler
Res. da Pampulha		
<i>Brachionus urceolaris</i>	164,7 ± 33,6	387,5 ± 43,9
<i>Keratella tropica</i>	61,3 ± 60,3	140,7 ± 14,4
<i>Keratella cochlearis</i>	22,8 ± 1,3	63,9 ± 3,1
<i>Thermocyclops decipiens</i>	36 ± 1,9	76,1 ± 19,3
Nauplii	640,5 ± 173,2	852 ± 24,3
Res. de Furnas (valores de 3 amostras integradas contadas na totalidade)		
<i>Bosmina</i> spp.	1,7	1,2
<i>Diaphanosoma</i> spp.	0,8	0,3
<i>Moina</i> spp.	1,5	0,4
Copepodes adultos	1,7	3,8
Copepoditos	16,7	22,8
Nauplii	1,3	3,9

2.7 COMPARAÇÃO DE EFICIÊNCIA DE CAPTURA DOS AMOSTRADORES

Há, na literatura, vários artigos comparando diferentes técnicas de amostragem de zooplâncton (Langfold, 1953; Patalas, 1954; Schindler, 1969; Bottrell *et al.*, 1976; De Bernardi, 1984; Suzuki & Bozelli, 1998). Embora haja considerável divergência entre esses estudos, algumas tendências gerais podem ser traçadas. As armadilhas (Schindler e Clarke-Juday) estão entre os aparatos mais eficientes para coleta de organismos de grande porte, como calanóides e ciclopóides, *Daphnia* e *Diaphanosoma* (Langfold, 1953; Bottrell *et al.*, 1976; Schindler, 1969). Outros autores afirmam, por exemplo, que as bombas conseguem amostrar rotíferos e pequenos cladóceros assim como estágios imaturos de copépodes de modo muito eficiente, especialmente quando comparadas a redes e garrafas amostradoras (Waite & O'Grady, 1980; Suzuki & Bozelli, 1998). As bombas também seriam mais adequadas para amostrar potamoplâncton (Bottrell *et al.*, 1976) ou ambientes com elevada presença de vegetação aquática. Essas tendências devem, no entanto, ser avaliadas com alguma cautela. A eficiência dos amostradores varia de acordo com a época do ano e mesmo dentro de um ciclo nictemeral, já que, à noite, organismos como larvas de dípteros podem estar presentes nas amostras (Patalas, 1954; Ruttner-Kolisko, 1977a).

As bombas vêm ganhando considerável preferência no estudo de zooplâncton de águas continentais no Brasil (Suzuki & Bozelli, 1998). No entanto, alguns estudos sugerem cautela, mesmo considerando (ainda que preliminarmente) que as bombas possuem alta eficiência de amostragem. Alguns organismos zooplânctônicos são fortemente reotácteis. O fluxo gerado pelas bombas é, por natureza, seletivo, uma vez que coletará proporcionalmente mais animais que sejam maus nadadores. Assim, mesmo coletando grande número de organismos de todas as categorias, as bombas alterarão a composição relativa ao aumentar a concentração relativa dos organismos maus nadadores. Outro ponto a ser considerado é que as unidades amostrais coletadas por bombas serão as mais afetadas pela distribuição em mosaico típica do zooplâncton. De Bernardi (1984) afirmou que a falsa impressão de que as bombas são amostradores eficientes é causada, tão somente, pela incapacidade desse tipo de amostragem de detectar e minorar os efeitos da distribuição em mosaico da comunidade zooplânctônica. Assim, o fato de um amostrador coletar maior número de organismos por unidade de volume filtrado não quer dizer, necessariamente, que ele seja mais eficiente.

2.8 PRESERVAÇÃO DE ZOOPLÂNCTON

A preservação de zooplâncton pode ser realizada pela adição de agentes químicos ou por meio de diferentes processos físicos, sem necessidade de aditivos químicos. Há vários métodos de comprovada eficácia na preservação dos organismos e sua escolha vai depender do tipo de estudo a ser conduzido. A Figura 9.3 ilustra o resultado de dois tipos de preservação química (formalina com corante) e física (congelamento com posterior liofilização).

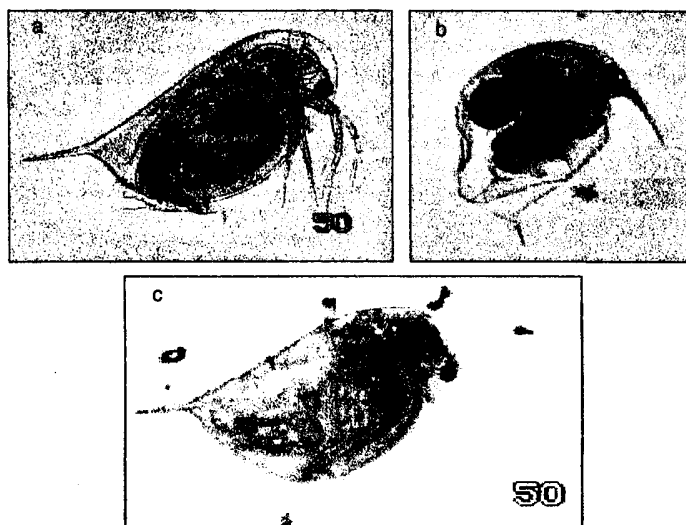


Figura 9.3 Técnicas de fixação de zôoplâncton. a) Exemplar de *Daphnia laevis* (res. da Pampulha) levemente narcotizado; b) exemplar de *Bosmina* sp. (res. de Furnas) fixado com formalina 4%, tamponada e corado com rosa de Bengala; e c) *Daphnia laevis* (res. da Pampulha), liofilizado.

A preservação química de organismos zooplânctônicos normalmente é feita em solução aquosa de formol. A solução de formalina utilizada para fixação de zooplâncton deve ter concentração final entre 3% e 4%. Para obter essa concentração, basta adicionar formol na proporção de uma parte do fixador para nove partes de água, já que o formol é fornecido comercialmente na concentração de 37%.

O formol normalmente tem ação ácida que, com o tempo, pode causar danos aos animais. Dessa forma, recomenda-se tamponagem dessa solução ao pH neutro utilizando bórx. Técnica muito comum é a adição de sacarose (1:4) na solução de formalina (Haney & Hall, 1973). O açúcar combina com a quitina dos organismos, endurecendo-a, e, portanto, torna as amostras mais resistentes à ação do tempo. Variação desse método foi proposta por Prepas (1978), a qual consiste no tratamento das amostras com solução menos concentrada do agente fixador (2% formalina + 60 g.L⁻¹ de sacarose) tamponada com borato de sódio. As amostras assim fixadas devem ser conservadas em geladeira.

Outro problema refere-se à rapidez de fixação. A adição de formol normalmente causa morte demorada dos microorganismos e muitos deles se contraem, expelem o conteúdo dos intestinos ou perdem os sacos ovígenos durante esse processo. Recomenda-se, portanto, adição de anestésico antes da fixação. Isso pode ser realizado pela adição de água mineral gasosa ou então, simplesmente, pela adição de água gelada (4°C) antes da fixação.

Alguns autores recomendam fixação com etanol. O material coletado é imediatamente imerso em etanol 95%. Esse tipo de fixador causa morte imediata dos animais e evita, com isso, os problemas derivados da adição de formalina (distorção de corpos, perda de

ovos e embriões das carapaças e modificações no volume das carapaças de cladóceros). Portanto, a fixação com etanol tem sido preferida quando se trata de estudos em que parâmetros demográficos são necessários (Hall, 1964).

Uma das características essenciais dos organismos zooplanctônicos refere-se à sua elevada transparência. A adição de corantes pode, em muitos casos, facilitar a contagem e o processo de identificação dos organismos. Corante muito utilizado é o Rosa de Bengala. Como se trata de corante vital, obtêm-se melhores resultados se sua adição for realizada logo após a coleta, antes do uso do anestésico. No entanto, tem sido cada vez mais frequente o uso de câmaras de vídeo acopladas ao equipamento óptico, o qual geralmente permite ao usuário regular o contraste e o brilho da imagem. O iodo presente no corante Rosa de Bengala apresenta elevado grau de opacidade, diminuindo muito a resolução das imagens. Portanto, não se recomenda o uso de Rosa de Bengala em unidades amostrais destinadas a contagens em equipamentos ópticos com monitor de vídeo CCD.

O uso de formalina para preservação de protozoários não é indicado, uma vez que este agente danifica as células mais delicadas ou as distorce, impedindo a determinação taxonômica da maioria das espécies. Para ciliados e flagelados, recomenda-se o uso de solução saturada de cloreto de mercúrio (HgCl_2) na proporção de 1:20, junto com algumas gotas do corante azul de bromofenol na concentração 0,04% (Pace & Orcutt, 1981). Para rotíferos e grandes ciliados, pode-se usar lugol acético com bons resultados. No entanto, como o iodo cora todas as partículas biogênicas, torna-se particularmente difícil diferenciar protozoários de outras partículas em amostras com concentrações elevadas de seston.

O uso de preservativos químicos é adequado somente se as unidades amostrais são destinadas a contagens. Técnica muito utilizada na preservação de zooplâncton e que dispensa uso de preservativos químicos consiste no uso de secagem em estufa, a temperaturas moderadas (60°C, durante 24 horas) (McCauley, 1984). Após secar, as amostras são estocadas em dissecador com sílica gel. Esta técnica tem sido muito usada para determinar o peso seco dos organismos (Masundire, 1994).

Muitos estudos ligados à ecofisiologia e à bioquímica requerem fixação do zooplâncton sem usar calor ou preservativos químicos. Técnicas mais modernas têm utilizado congelamento rápido e posterior liofilização (Berberovic & Pinto-Coelho, 1989). Essas técnicas vêm sendo preferidas em certos tipos de estudos, como, por exemplo, em pesquisas que envolvem determinações mais precisas de biomassa, estudos sobre composição elementar (C, N e P), bioquímica (carboidratos, lipídios, enzimas, ácidos nucleicos) ou de natureza toxicológica (metais traço, biocidas). O zooplâncton pode ser congelado a diferentes temperaturas, no congelador (freezer) convencional (-18°C), utilizando gelo seco (-44°C) ou nitrogênio líquido (ponto de ebulição -195,8°C). Uma vez congelado, o zooplâncton é liofilizado. A liofilização consiste em processo de secagem a ultravácuo (0,6 a 1×10^{-4} atm), em que a água é sublimada, ou seja, passa diretamente do estado sólido para o de vapor. Esse processo garante a manutenção das estruturas dos organismos, bem como a qualidade bioquímica das amostras.

2.9 CONTAGEM DE ZOOPLÂNCTON

A contagem do zooplâncton envolve grande multiplicidade de técnicas. Pode-se afirmar que não há uma técnica ideal para contagem de zooplâncton. Cada uma tem diversas vantagens e desvantagens. Normalmente, a contagem de zooplâncton envolve a escolha entre trabalhar com pequenas subamostras e contá-las em microscópio com grande resolução óptica ou trabalhar com grandes subamostras, ou mesmo toda a unidade amostral, e utilizar estereomicroscópio com menor resolução óptica.

Há, basicamente, dois métodos de enumeração de organismos zooplanctônicos: (a) Contagem em microscópio, utilizando uma das seguintes lâminas de contagem: Neubauer ($h = 0,100$ mm, $A = 0,0625$ mm²), Fuchs-Rosenthal ($h = 0,200$ mm, $A = 0,0625$ mm²) e SedgwickRafter (vol = 1 ml).

As duas primeiras podem ser usadas para pequenos organismos do nanoplâncton, ou seja, organismos maiores do que 2 μ m. (b) Para o picoplâncton, utiliza-se normalmente contagem direta dos microorganismos após serem retidos em filtro de membrana (0,2 μ m) e previamente corados pela técnica DAPI, no aumento 1.000X, em microscópio de epifluorescência (Porter & Feig, 1980).

Contagem de micro e mesozooplâncton, cujas dimensões estão acima dos 20 μ m, normalmente é feita com a cubeta de Sedgwick-Rafter. Existem vários tipos dessas cubetas, sendo os mais comuns a de vidro, sem retículo, que possibilita melhor resolução óptica, e a cubeta de plástico, com retículo, que é mais prática para demarcação dos transecções de contagem. Essas cubetas são ideais para contagem de microzooplâncton (protozoários de grande porte, rotíferos, nauplius).

A contagem de pequenas alíquotas em microscópio exige subamostragem. Esse procedimento pode envolver erro muito grande se não for realizado de modo adequado. Desaconselha-se o uso de pipetas convencionais, por terem orifício de abertura pequeno e, portanto, seletivo. Para essa finalidade, foram desenvolvidas pipetas não seletivas de Hensen-Stempel, capazes de realizar subamostragens aleatórias, não seletivas. As pipetas de Hensen-Stempel podem ser adquiridas com diversas capacidades variáveis entre 1, 2, 5 e 10 ml.

As contagens realizadas em microscópio estereoscópico exigem cubetas maiores e específicas. Há cubetas redondas, serpentinas, etc. A cubeta de acrílico serpentina desenvolvida por W. Geller, no Instituto Limnológico de Konstanz, é um bom exemplo dessas cubetas (Figura 9.4).

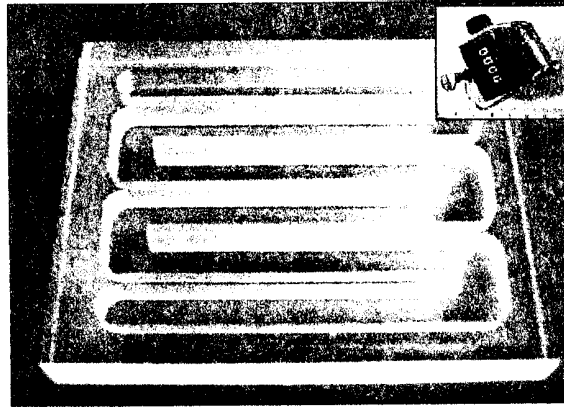


Figura 9.4 Cubeta de contagem serpentinada de acrílico, desenvolvida no Limnologisches Institut, Universität Konstanz e construída na oficina do ICB/UFMG em 1995.

2.10 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA DE ZOOPLÂNCTON

A determinação da biomassa de organismos planctônicos é fundamental para conhecer a estrutura dessa comunidade. Muitos estudos realizados sobre zooplâncton no Brasil focalizaram apenas as abundâncias dos organismos. Dados de abundância podem levar a generalizações um tanto simplistas sobre o real significado dos organismos dentro da comunidade. Rotíferos, por exemplo, geralmente são os organismos mais abundantes na maioria das comunidades zooplânctônicas. Entretanto, a avaliação mais realista do verdadeiro significado ecológico de cada grupo da comunidade zooplânctônica requer certamente a comparação de suas biomassas.

Há dois métodos para avaliar biomassa do zooplâncton: método gravimétrico e método alométrico. Normalmente, ambos podem produzir resultados confiáveis. Isto, no entanto, dependerá de vários fatores. Os dois métodos produziram resultados comparáveis para uma população de *Daphnia laevis* na represa da Pampulha (Figura 9.5).

O método gravimétrico baseia-se na pesagem de amostras previamente secas. Apesar de relativamente simples, este método impõe tomada de uma série de cuidados destinados a minorar os erros associados à técnica. O uso de balança de grande precisão e acurácia é recomendado (0,000001 g). Além disso, cuidados especiais no preparo das amostras devem ser tomados. Como o zooplâncton seco é altamente higroscópico, correções para absorção de água devem ser feitas, sobretudo se a umidade relativa do ar for superior a 70%. Outro ponto importante a considerar refere-se à forma de fixação do material. Embora constem na literatura fatores de correção de biomassa para amostras fixadas com formol (Giguère *et al.*, 1989), recomenda-se fixação por congelamento rápido seguida de liofilização. Além de prevenir perdas ou ganhos de biomassa, essa técnica também preserva melhor as dimensões lineares dos animais (Berberovic & Pinto-Coelho, 1989).

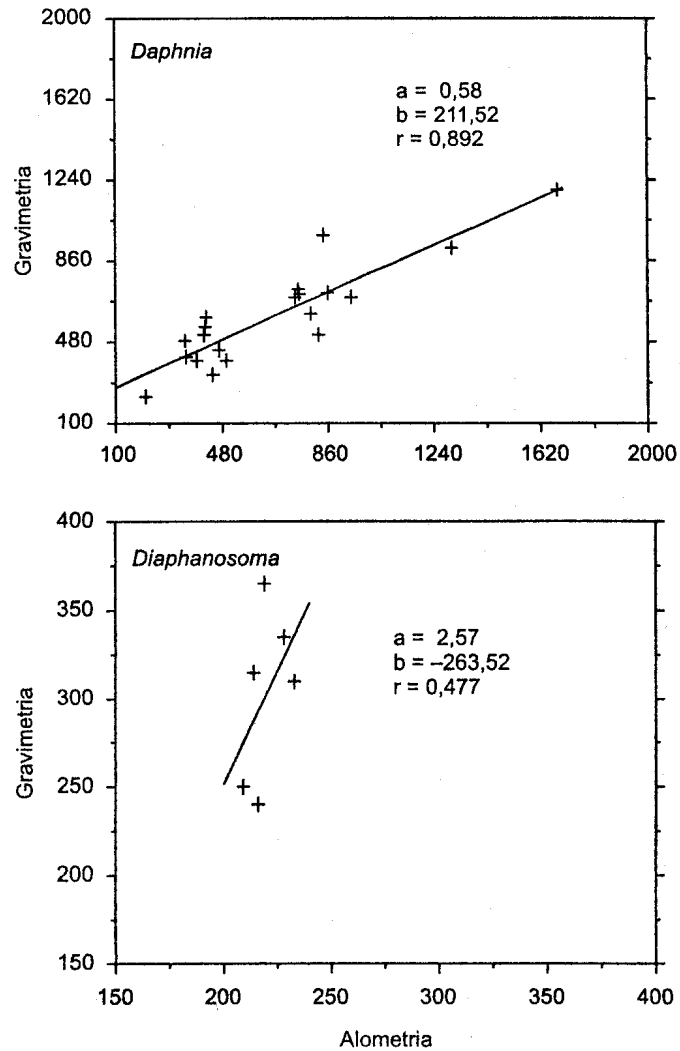


Figura 9.5 Comparação dos métodos alométrico e gravimétrico para dois organismos zooplanctônicos do reservatório da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerias. Espécimes coletados entre setembro e dezembro de 1994.

O método alométrico baseia-se no uso de equações exponenciais ajustadas a partir da relação entre as dimensões lineares dos organismos e seu peso seco. Esses coeficientes podem ser obtidos por meio de regressões entre o comprimento do animal *versus* o peso individual. Normalmente, as equações têm as seguintes fórmulas:

$$B = a.L^b$$

$$\ln B = c + b.\ln L$$

em que:

a e b são coeficientes específicos para cada espécie.

Há, na literatura, grande quantidade dessas regressões (Tabela 9.3). Notar que $c = \ln a$. O parâmetro **a** (ou **c**) refere-se à interseção no eixo das ordenadas e o parâmetro **b**, à inclinação da reta de regressão entre as variáveis dependente ($B =$ ordenada, ou eixo **y**) e independente ($L =$ abscissa, ou eixo **x**). A Tabela 9.3 fornece alguns desses coeficientes para organismos zooplanctônicos comumente encontrados em lagos e reservatórios.

Tabela 9.3 Coeficientes alométricos (**a** e **b**) para alguns organismos típicos do zooplâncton. Os coeficientes **a** e **b** devem ser aplicados na equação apresentada anteriormente.

Organismo	Amplitude de compr. (mm)	a	b	Referência bibliográfica
<i>Mesocyclops leuckarti</i>	0,33-1,14	3,56	2,26	Bottrell <i>et al.</i> , 1976
<i>Thermocyclops hyalinus</i>	0,31-0,68	1,97	0,89	Bottrell <i>et al.</i> , 1976
Cyclopoida	—	5,87	2,74	Pace & Orcutt, 1981
<i>Eudiaptomus gracilioides</i>	0,36-0,81	5,10	3,19	Persson & Eckbohm, 1980
<i>Diaptomus sicilioides</i>	—	2,86	2,46	Pace & Orcutt, 1981
Nauplii	0,16-0,30	2,01	0,57	Rosen, 1981
<i>Daphnia galeata</i>	0,60-2,20	14,01	2,64	Bottrell <i>et al.</i> , 1976
<i>Daphnia hyalina</i>	0,60-2,20	11,71	2,46	Bottrell <i>et al.</i> , 1976
<i>Daphnia magna</i>	1,40-3,60	12,30	1,80	Dumont <i>et al.</i> , 1975
<i>Daphnia pulex</i>	0,95-3,40	4,33	3,19	Bottrell <i>et al.</i> , 1976
<i>Daphnia pulex</i>	0,55-1,60	11,94	2,63	Burns, 1969
<i>Daphnia parvula</i>	—	4,22	1,80	Pace & Orcutt, 1981
<i>Daphnia</i> spp.	0,50-2,50	6,00	3,62	Pinto-Coelho, 1991
<i>Diaphanosoma brachiurum</i>	0,40-1,20	3,63	3,04	Rosen, 1981
<i>Diaphanosoma</i> spp.	0,40-1,50	6,95	2,07	Pinto-Coelho, 1991
<i>Moina micrura</i>	—	9,00	2,76	Saint-Jean & Bonou, 1994
<i>Bosmina longirostris</i>	0,28-0,54	15,05	2,53	Bottrell <i>et al.</i> , 1976
<i>Ceriodaphnia quadrangula</i>	0,30-0,71	12,96	3,34	Bottrell <i>et al.</i> , 1976
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	—	16,94	3,15	Pace & Orcutt, 1981

Masundire (1981) publicou regressões de comprimento *versus* peso para alguns organismos zooplanctônicos tropicais (lago Kariba, África). Os dados de comprimento estão em μm . A autora usou a equação $y = c + bx$, em que $x = \ln L$ (μm) e $y =$ peso seco em microgramas (Tabela 9.4).

Tabela 9.4 Coeficientes alométricos para alguns organismos do zooplâncton do lago Kariba (África) publicados por Masundire (1994).

Organismo	Tamanho (µm)	c	b	R (Pearson)
<i>Bosmina longirostris</i>	230-360	-9,18	1,60	0,81
<i>Ceriodaphnia cornuta</i>	459-650	-13,41	2,18	0,89
<i>Thermocyclops</i> (copepoditos)	372-614	-13,72	2,12	0,87
<i>Thermocyclops</i> (fêmeas)	665-825	-14,03	2,20	0,98
<i>Thermocyclops</i> (adultos)	620-820	-18,87	2,93	0,97

No caso de rotíferos, o uso de métodos gravimétricos é desaconselhável, dadas as pequenas biomassas desses organismos. A metodologia usual envolve primeiro a determinação do biovolume, o qual é estimado a partir de medidas lineares simples. O biovolume de algumas espécies de rotíferos pode ser calculado a partir da Tabela 9.5, que foi baseada em volumes geométricos aproximados à forma do corpo de cada rotífero. Para vários gêneros, é fornecida uma fórmula simplificada que usa uma única dimensão linear, normalmente o comprimento, sem espinhos ou apêndices. Essas medidas devem ser tomadas com o animal vivo, levemente narcotizado (McCauley, 1984).

Tabela 9.5 Biovolume de alguns rotíferos. Modificado e simplificado de Ruttner-Kolisko (1977b).

Espécie	Forma geométrica aproximada	A	B	C	Biovolume fórmula
<i>Keratella cochlearis</i>	meio cone	A = h	B = 2r	—	V = 0,13 (a.b ²) Vs = 0,02 (a) ³
<i>Keratella tropica</i>	paralelepípedo	A = h	B = 0,7a	C = 0,33a	V = a.b.c Vs = 0,22 (a) ³
<i>Brachionus</i>	elipsóide	Comp.	Larg B = 0,6a	Altura C = 0,4a	V = 0,53 (a.b.c) Vs = 0,23 (a) ³
<i>Conochilus</i>	esfera (colônia) cone (indivíduo)	A = h	B = 2r	C = 2r	V = 4,2 (a) ³ V = 0,26 a.b ²
<i>Filinia</i>	elipsóide de revol.	A = 2r ₃	B = 2r ₁ (r ₁ = r ₂)	C = 2r ₂ (r ₁ = r ₂)	V = 0,52 (a.b ²) Vs = 0,13 (a) ³
<i>Gastropus</i>	cilindro elíptico	A = 2r ₂	B = 2r ₁	C = h	V = 0,8 (a.b.c) Vs = 0,20 (a) ³
<i>Hexarthra</i>	cone	A = h	B = 2r	C = 2r	V = 0,26 (a.b ²) V = 0,13 (a) ³
<i>Polyarthra</i>	paralelepípedo	A = h	B = 0,7a	C = 0,4a	V = a.b.c Vs = 0,28 (a) ³
<i>Synchaeta</i>	cone	A = h	B = 2r B = 0,6a	—	V = 0,26 (a.b ²)
<i>Trichocerca</i>	cilindro + cone	A = 2h	B = 2r	—	V = 0,52 (a.b ²)

Vs = volume simplificado utilizando apenas a maior dimensão linear, geralmente o comprimento do animal (a).

Uma vez calculado o biovolume, é realizada conversão para peso fresco, utilizando fator de conversão. Há vários fatores para conversão de peso fresco em peso seco, sendo que a maioria deles está dentro da faixa de 0,05 a 0,1 (McCauley, 1984). Já há na literatura coeficientes de conversão específicos para diferentes espécies de rotíferos (Pauli, 1990).

3. SUGESTÕES E PERSPECTIVAS

Considerando o anteriormente exposto, recomendam-se as metodologias de coletas apresentadas na Tabela 9.6 para a coleta de organismos zooplancônicos nos diversos tipos de ambientes.

Tabela 9.6 Sugestões para metodologias de coleta de zooplâncton em diferentes tipos de ambientes.

Local	Microzooplâncton ($< 200 \mu\text{m}$)	Mesozooplâncton ($> 200 \mu\text{m}$)
Águas abertas em lagos e reservatórios com prof. superior a 3 m	garrafas, tubos ou bombas	armadilhas de Schindler/Clarke-Juday, planctonômetros ou redes com cone
Lagos rasos ($z < 3 \text{ m}$)	garrafas, tubos ou bombas	armadilhas, tubos ($d > 5 \text{ cm}$) ou redes com cone
Lagos com vegetação ou zona litorânea	garrafas, tubos ou bombas	garrafas, tubos ($d > 5 \text{ cm}$), redes com cone
Rios de grande porte	garrafas ou bombas	garrafas, redes com cone

4. OUTRAS RECOMENDAÇÕES

- Cuidado especial deve ser tomado com o uso do termo zooplâncton. Organismos planctônicos formam comunidade composta de organismos especialmente adaptados à vida em águas abertas durante a maior parte de seu ciclo vital. Deve haver distinção entre esses organismos e aqueles típicos da fauna psâmica, da zona litorânea de lagos e reservatórios ou aqueles que vivem associados às macrófitas, sejam elas submersas ou flutuantes. Tais organismos podem estar presentes em amostras de plâncton, principalmente na zona de influência dos rios nos reservatórios ou então durante a estação chuvosa. Nesses casos, é comum a presença de organismos não euplanctônicos, como protozoários (certos tipos de tecamebas), cladóceros (*Alona*), copépodes harpacticóides ou larvas de quironomídeos. A análise desses organismos deve ser realizada de modo apropriado, considerando sua origem e seus verdadeiros hábitos de vida.
- Usar sempre que possível dados de biomassa juntamente com os dados de abundância em censos sobre dinâmica sazonal e espacial de zooplâncton.

- Recalibrar as equações alométricas para determinar a biomassa dos principais organismos zooplânctônicos no Brasil.
- Estabelecer programas de intercalibração de metodologias de coleta, preservação, identificação e enumeração de organismos planctônicos encontrados nos principais ecossistemas lacustres e fluviais brasileiros e sul-americanos.
- Em estudos sobre bioquímica e ecofisiologia dar preferência a métodos físicos para a preservação do zooplâncton.

5. AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao prof. Carlos Eduardo de Mattos Bicudo pelo convite para participar do Simpósio Biodiversidade/FAPESP, realizado entre os dias 20 e 23 de junho de 1999 na cidade de Campos do Jordão (SP). Esta contribuição foi parcialmente financiada pelo convênio Secretaria Municipal do Meio Ambiente/Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (SMMA-PBH), em convênio com a Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa da UFMG e pelo convênio FUNDEP/UFMG número 3443, Curso Fundamentos de Ecologia e Tópicos em Gestão Ambiental (curso de atualização).

LITERATURA CITADA

- BERBEROVIC, R.; PINTO-COELHO, R. M. Dry first, measure later: a new procedure to preserve and measure zooplankton for ecophysiological studies. *J. Plankton Res.*, v. 11, n. 5, p. 1109-1116, 1989.
- BOTTRELL, H. H. et al. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.*, v. 24, p. 419-456, 1976.
- BURNS, C. W. Relation between filtering rate, temperature and body size in four species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, v. 14, p. 693-700, 1969.
- DE BERNARDI, R. Methods for the estimation of zooplankton abundance. In: DOWNING, J.; RIGLER, F. H. (Eds.). *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. Blackwell Scientific Publication, 1984. p. 59-86. (IBP Handbook, n. 17).
- DUMONT, H. J.; VAN DE VELDE, I.; DUMONT, S. The dry weight estimate of biomass in a selection of Cladocera, Copepoda and Rotifera from the plankton, periphyton and benthos of continental waters. *Oecologia*, v. 19, p. 75-97, 1975.
- DUSSART, B. H. Les différentes catégories du plancton. *Hydrobiologia*, v. 26, p. 72-74, 1965.
- EDMONDSON, W. T. (Ed.). *Whipple fresh-water biology*. New York: John Wiley & Sons, 1959. 1248 p.
- EJMONT-KARABIN, J. Studies on the usefulness of different mesh-size plankton nets for thickening zooplankton. *Ekol. Pol.*, p. 479-490, 1978.
- GIGUÈRE, L. A. et al. Can we estimate the true weight of zooplankton after chemical preservation? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 46, p. 522-527, 1989.
- HALL, D. J. An experimental approach to the dynamics of a natural population of *Daphnia galeata mendotae*. *Ecology*, v. 45, n. 1, p. 94-112, 1964.
- HANEY, J. F.; HALL, D. J. Sugar coated *Daphnia*: a preservation technique for cladocera. *Limn. Oceanogr.*, v. 18, p. 331-333, 1973.
- LANGFOLD, R. R. Methods of plankton collection and a description of a new sampler. *J. Fish. Res. Board. Can.*, v. 10, p. 238-252, 1953.

- MCCAULEY, E. The estimation of the abundance and biomass in samples. In: DOWNING, J.; RIGLER, F. H. (Eds.). *A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. Blackwell Scientific Publication, 1984. p. 228-265. (IBP Handbook, n. 17).
- MARGALEF, R. *Limnología*. Barcelona: Ediciones Omega S.A., 1983. 1010 p.
- MASUNDIRE, H. Mean individual dry weight and length-weight regressions of some zooplankton of Lake Kariba. *Hydrobiologia*, v. 272, p. 231-238, 1994.
- PACE, M.; ORCUTT JR., J. D. The relative importance of protozoans, rotifers and crustaceans in a freshwater zooplankton community. *Limn. Oceanogr.*, v. 26, n. 5, p. 822-830, 1981.
- PATALAS, K. Comparative studies on a new type of self acting water sampler for plankton and hydrochemical investigations. *Ekol. Pol.*, v. 2, p. 231-242, 1954.
- PAULI, H. R. A new method to estimate individual dry weights of rotifers. *Hydrobiologia*, v. 186/187, p. 335-361, 1990.
- PENNAK, R. W. *Fresh-water invertebrates of the United States*. 2nd. ed. New York: Wiley-Interscience, 1978. 803 p.
- PERSSON, G.; ECKBOHM, G. Estimation of dry weight in zooplankton populations: Methods applied to crustacean population from lakes in the Kuokkel Area, Northern Sweden. *Arch. Hydrobiol.*, v. 89, p. 225-246, 1980.
- PINTO-COELHO, R. M. *Zooplankton grazing in Lake Constance*: in situ measurements of temporal variations, relative contributions of size fractions and major herbivores, regulatory factors of specific filtering rates and potential impact as loss factor for phytoplankton. 1991. 200 f. Thesis (PhD) – Universität Konstanz.
- PORTER, K.G.; FEIG, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, v. 25, n. 5, p. 943-948, 1980.
- PREPAS, E. Sugar-frosted *Daphnia*: an improved fixation technique for Cladocera. *Limnol. Oceanogr.*, v. 23, p. 557-559, 1978.
- ROSEN, R. Length-dry weight relationships of some freshwater zooplankton. *J. fresh. Ecol.*, v. 1, p. 225-227, 1981.
- RUTTNER-KOLISKO, A. Comparison of various sampling techniques and results of repeated sampling of planktonic rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, v. 8, p. 13-18, 1977a.
- RUTTNER-KOLISKO, A. Suggestions for biomass calculation of planktonic rotifers. *Arch. Hydrobiol.*, v. 8, p. 71-77. 1977b. (Beih./Ergebn.).
- SAINT-JEAN, L.; BONOU, C. A. Growth, production, and demography of *Moina micrura* in brackish tropical fishponds (Layo, Ivory Coast). In: DUMONT, A.; GREEN, H. J.; MASUNDIRE, J. (Eds.). *Studies on the ecology of tropical zooplankton*. *Hydrobiologia*, v. 272, p. 125-146, 1994.
- SCHINDLER, D. W. Two useful devices for vertical plankton and water sampling. *J. Fish. Res. Board Can.*, v. 26, p. 1948-1955, 1969.
- SUZUKI, B. K.; BOZELLI, R. L. Avaliação da eficiência de três amostradores na estimativa de abundância de organismos zooplancônicos na lagoa Cabiúnas. In: ESTEVES, F. A. (Ed.). *Ecologia de lagoas costeiras do parque nacional da Restinga de Jurubatiba e do Município de Macaé (RJ)*. Rio de Janeiro: Núcleo de Pesquisas Ecológicas de Macaé, UFRJ, 1998. p. 273-282.
- TRANter, D. J.; HERON, A. C. Filtration characteristics of Clarke Bumpus samplers. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, v. 16, p. 281-291, 1965.
- TRANter, D. J.; HERON, A. C. Experiments on filtration of plankton nets. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, v. 18, p. 89-111, 1967.
- WAITE, S. W.; O'GRADY, S. M. Description of a new submersible filter-pump apparatus for sampling plankton. *Hydrobiologia*, v. 74, p. 187-191, 1980.

Amostragem é tema central e unificador em ecologia. Para avançar na identificação de padrões e de sua escala de variação, alguns dos requisitos básicos são a percepção conceitual do ecossistema ou de parte deste e a realização de estudos comparativos com vistas às generalizações. Neste sentido, o planejamento amostral, o tratamento numérico dos dados e os métodos de coleta são condições preliminares indispensáveis para o sucesso de qualquer pesquisa.

Amostragem em Limnologia é fruto da inquietude em relação à importância do planejamento da pesquisa e da uniformização de métodos de amostragem e de coleta de dados à luz do conhecimento já adquirido pela comunidade de especialistas de nosso país. Este livro não é uma compilação de informações, mas o resultado da vivência e da pesquisa dos colegas que colaboraram para sua consecução.

A obra não pretende, de forma alguma, esgotar o tema, mas sim preencher uma lacuna na literatura nacional, fornecendo os primeiros passos na tentativa de responder às inúmeras e infundáveis perguntas dos que querem ingressar ou ampliar sua atuação na área da Limnologia.

Carlos E. de M. Bicudo
Denise de C. Bicudo

ISBN 85-86552-82-8

