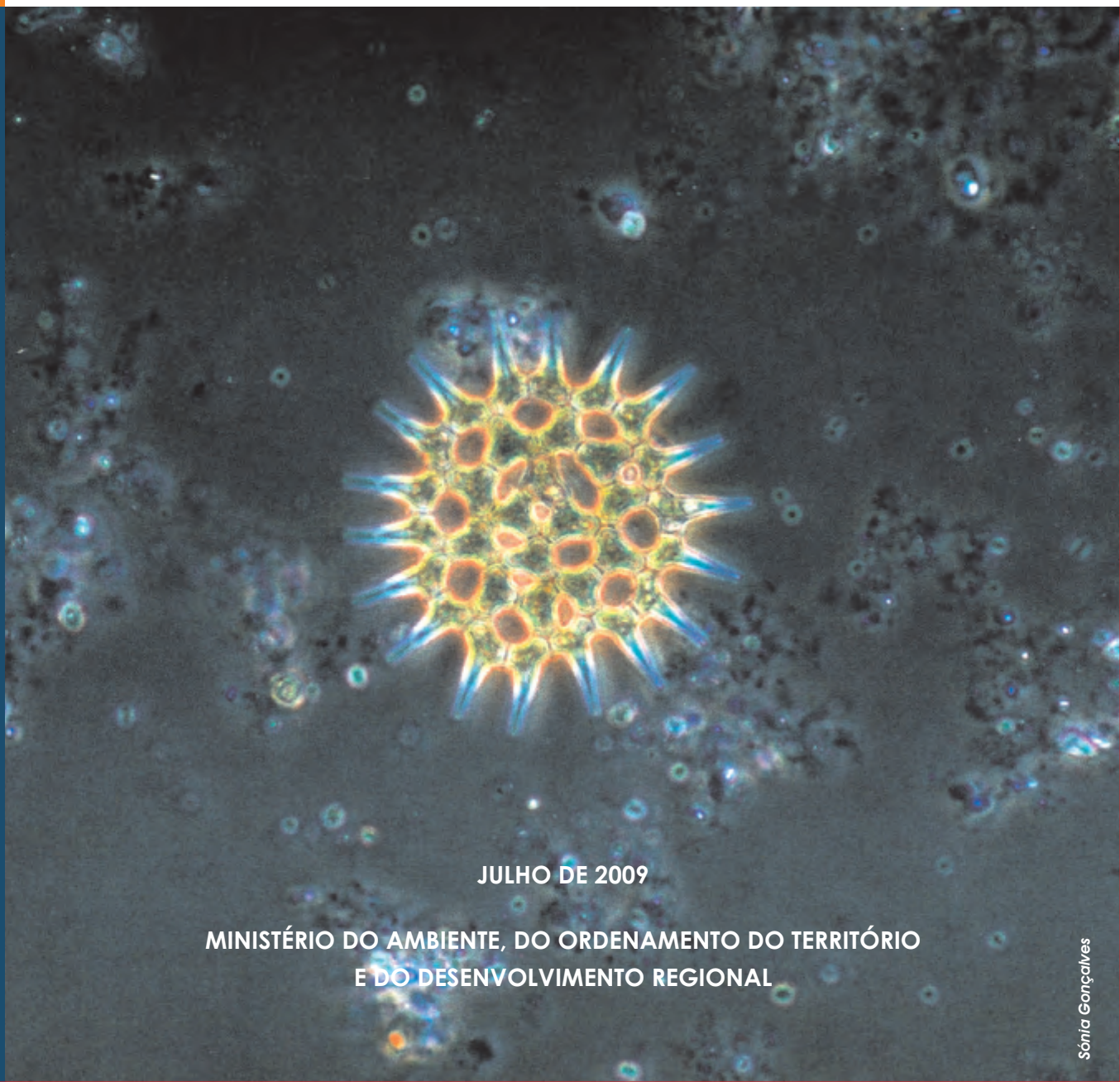




INSTITUTO  
DA ÁGUA, I.P.

# MANUAL PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE BIOLÓGICA DA ÁGUA EM LAGOS E ALBUFEIRAS SEGUNDO A DIRECTIVA QUADRO DA ÁGUA

## Protocolo de amostragem e análise para o Fitoplâncton



JULHO DE 2009

MINISTÉRIO DO AMBIENTE, DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO  
E DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL



# **MANUAL PARA A AVALIAÇÃO DA QUALIDADE BIOLÓGICA DA ÁGUA EM LAGOS E ALBUFEIRAS SEGUNDO A DIRECTIVA QUADRO DA ÁGUA**

## **Protocolo de amostragem e análise para o Fitoplâncton**

### **Colaboraram neste documento:**

João Pádua (Coordenação), Isabel Andrade, Fátima Brito, Lourenço Gil, Leonor Cabeçadas, Margarida Réis, Sónia Gonçalves, Armanda Rodrigues, João Bernardo, Manuela Morais, Vitor Vasconcelos, Maria Margarida Medeiros, Dina Medeiros, Paulo Pereira, Rosário Coelho, Dulce Lourenço, Maria Felisbina Quadrado, Maria Helena Alves, João Ferreira, Maria João Rasga.

Este documento deve ser citado do seguinte modo:

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

Julho de 2009

MINISTÉRIO DO AMBIENTE, DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO  
E DO DESENVOLVIMENTO REGIONAL

**Edição**

Instituto da Água, I.P.

**Coordenação**

João Pádua

**Produção gráfica**

Carla Santos

**Impressão e acabamento**

Núcleo de Imagem e Comunicação  
Divisão de Informação e Tecnologias  
Departamento de Serviços Gerais  
Instituto da Água, I.P.

**Julho, 2009**

## ÍNDICE

<b>1. ENQUADRAMENTO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PRINCÍPIOS TEÓRICOS .....</b>	<b>3</b>
2.1. DEFINIÇÃO .....	3
2.2. VALOR INDICADOR DO FITOPLÂNCTON .....	3
2.3. ÍNDICES DE QUALIDADE .....	4
2.3.1. BIOMASSA FITOPLANCTÓNICA .....	5
2.3.2. COMPOSIÇÃO E ABUNDÂNCIA .....	5
2.3.3. FREQUÊNCIA E INTENSIDADE DE FLORESCÊNCIAS FITOPLANCTÓNICAS .....	6
<b>3. PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM.....</b>	<b>7</b>
3.1. PERÍODO E FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM .....	7
3.2. SELECÇÃO DO LOCAL DE AMOSTRAGEM .....	8
3.3. TIPOS DE AMOSTRA .....	9
3.4. EQUIPA DE AMOSTRAGEM E MATERIAL .....	10
3.5. AMOSTRAGEM .....	12
3.6. PRESERVAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS .....	14
3.6.1. PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS .....	14
3.6.2. IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS .....	15
3.6.3. ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS .....	15
<b>4. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS - ANÁLISE DE PIGMENTOS.....</b>	<b>17</b>
4.1. EQUIPAMENTO, MATERIAL E REAGENTES .....	17
4.2. FILTRAÇÃO E CONSERVAÇÃO .....	19
4.3. EXTRACÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO .....	19
4.4. LEITURA ESPECTROFOTOMÉTRICA .....	20
<b>5. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS – IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM.....</b>	<b>22</b>
5.1. EQUIPAMENTO, MATERIAL E REAGENTES .....	22
5.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA .....	24
5.3. IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM .....	26
5.3.1. IDENTIFICAÇÃO .....	26
5.3.2. CONTAGEM .....	27
5.3.3. DENSIDADE FITOPLANCTÓNICA .....	30
5.4. CÁLCULO DO BIOVOLUME .....	31
<b>6. CONTROLO DE QUALIDADE .....</b>	<b>33</b>
6.1. CONTROLO DE QUALIDADE NA AMOSTRAGEM .....	33
6.2. CONTROLO DE QUALIDADE NO LABORATÓRIO .....	34
6.3. CONTROLO DE QUALIDADE DOS DADOS .....	35
<b>7. GLOSSÁRIO.....</b>	<b>37</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>40</b>

### ANEXOS

ANEXO I - FICHA DE CAMPO

ANEXO II - FICHA DE LABORATÓRIO

ANEXO III - BIBLIOGRAFIA DE IDENTIFICAÇÃO



## **1. ENQUADRAMENTO**

A Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Outubro de 2000 (Directiva Quadro da Água), transposta para a ordem jurídica nacional através da Lei da Água, Lei n.º58/2005 de 29 de Dezembro (Lei da Água) e do Decreto-Lei n.º77/2006 de 30 de Março, introduz o conceito de “estado ecológico”, que exprime a qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas aquáticos com base no “desvio ecológico” relativamente às condições de referência, condições sujeitas a pressões antropogénicas pouco significativas.

A classificação do “estado ecológico” é efectuada com recurso a indicadores de qualidade hidromorfológica, físico-química e biológica. O fitoplâncton é um dos indicadores de qualidade biológica utilizado na classificação do estado ecológico para a categoria de massas de água Lagos e do potencial ecológico para as massas de água fortemente modificadas – albufeiras. Segundo o Anexo V da Directiva Quadro da Água, são considerados três atributos da comunidade fitoplanctónica para a avaliação da qualidade ecológica:

- ✚ a biomassa fitoplanctónica
- ✚ a composição e abundância fitoplanctónica
- ✚ a intensidade e frequência de florescências fitoplanctónicas (*blooms*)

O presente documento tem como objectivo estabelecer medidas orientadoras no sentido de uniformizar os procedimentos de amostragem e análise do elemento de qualidade biológica fitoplâncton em sistemas lênticos, com vista à classificação do estado ecológico de lagos e do potencial ecológico de massas de água fortemente modificadas - albufeiras, de acordo com a Directiva Quadro da Água.

Neste protocolo são referidos os princípios teóricos, orientações e procedimentos de amostragem e de laboratório, de modo a garantir a comparabilidade dos resultados entre diferentes operadores e entidades. A componente laboratorial engloba a análise de pigmentos fotossintéticos, identificação taxonómica, contagem e cálculo de biovolumes dos organismos fitoplanctónicos. A classificação do estado ecológico de lagos e do potencial ecológico de massas de água fortemente modificadas – albufeiras, deve ser efectuada mediante a aplicação do sistema de classificação em vigor, tema não abordado no presente documento.

A elaboração do protocolo teve por base a experiência existente em Portugal, os conhecimentos técnico-científicos descritos na bibliografia da especialidade, o trabalho desenvolvido no âmbito da 1ª fase do Exercício de Intercalibração (Decisão

da Comissão 2008/915/CE, de 30 de Outubro) e os requisitos estabelecidos nas normas nacionais e internacionais, com especial atenção para as seguintes normas editadas ou em desenvolvimento:

EN ISO 5667-1:2006 *Water Quality – Sampling. Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques*

EN ISO 5667-3:2003 *Water Quality – Sampling. Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples*

ISO 5667-4:1987 *Water Quality – Sampling. Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made*

ISO 5667-5:2006 *Water Quality – Sampling. Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems*

NP 4327: 1996 *Qualidade da Água. Doseamento de clorofila *a* e dos feopigmentos por espectrofotometria molecular. Método de extracção com acetona*

EN 14996:2006 *Water Quality – Guidance on assuring the quality of biological and ecological assessments in the aquatic environment*

EN 15204:2006 *Water Quality – Guidance standard for routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy (Utermöhl technique)*

EN ISO 10260:1992 *Water Quality – Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*

CEN/TC230/WG2/TG3 N108 *Water Quality – Phytoplankton biovolume determination by microscopic measurement of cell dimensions*

CEN/TC230/WG2/TG3 N109 *Water Quality – Guidance on quantitative and qualitative sampling of phytoplankton from inland waters*

As orientações e procedimentos descritos no protocolo serão actualizados de acordo com o desenvolvimento técnico-científico e com os requisitos das futuras normas nacionais e internacionais.



## **2. PRINCÍPIOS TEÓRICOS**

### **2.1. DEFINIÇÃO**

O fitoplâncton é composto por organismos unicelulares microscópicos com capacidade fotossintética que vivem em suspensão na coluna de água e que podem ser solitários ou coloniais, de dimensões inferiores a 1 µm até colónias maiores do que 500 µm. Devido à dependência da luz solar habitam a zona eufótica, otimizando o tempo de residência nos estratos superiores da coluna de água através de diversas estruturas ou mecanismos (e.g. flagelos, vacúolos de gás, aumento da relação área superficial/volume).

O fitoplâncton abrange um conjunto de algas e cianobactérias diversificado do ponto de vista taxonómico, morfométrico e fisiológico, que apresentam diferentes requisitos e respostas a parâmetros físicos e químicos, como a luz, a temperatura, a alcalinidade e a concentração de nutrientes. Esta multiplicidade fisiológica do fitoplâncton permite a coexistência de diversas espécies em interacção contínua num mesmo volume de água (Hutchinson, 1961, Scheffer *et al*, 2003) e uma distribuição espacial e sucessão sazonal da comunidade em resposta a variações dos parâmetros ambientais.

A taxonomia do fitoplâncton é complexa e baseada na morfologia celular, ornamentação, cor, reservas alimentares e pigmentos fotossintéticos, sendo de destacar os seguintes grupos taxonómicos: Cyanobacteria (cianobactérias), Chlorophyceae (algas verdes), Chrysophyceae (crisofíceas), Bacillariophyceae (diatomáceas), Cryptophyceae (criptofíceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Euglenophyceae (euglenófitas) e Conjugatophyceae (e.g. desmidiáceas).

### **2.2. VALOR INDICADOR DO FITOPLÂNCTON**

O fitoplâncton apresenta ciclos de vida curtos (4/5 dias) e obtém os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento directamente da coluna de água, sendo o indutor e directo indicador biológico de alterações da concentração de nutrientes na coluna de água e de pressões associadas ao processo de eutrofização. A comunidade fitoplanctónica apresenta elevada sensibilidade a alterações de pequena escala nas condições ambientais (Hutchinson, 1967; Reynolds, 2006), sendo a sua dinâmica, biomassa, composição e abundância regulados pelos seguintes factores:

- Condições físicas e hidrológicas: luz, temperatura, tempo de residência da água, profundidade, área do espelho de água, volume.

- Características químicas da água: nutrientes e matéria orgânica, pH, alcalinidade, dureza, etc.
- Factores biológicos: filtradores planctófagos (zooplâncton e ictiofauna) e relações entre espécies (e.g. competição, efeito alelopático).

As definições normativas da Directiva Quadro da Água relativas ao elemento de qualidade biológica fitoplâncton em lagos (Tabela 1) indicam que a degradação da qualidade ecológica está associada ao incremento da biomassa fitoplanctónica, às alterações na composição taxonómica e abundância dos grupos presentes e ao aumento da frequência e intensidade de florescências fitoplanctónicas.

**Tabela 1 – Definição do estado ecológico “excelente”, “bom” e “razoável” em lagos para o elemento de qualidade biológica fitoplâncton (Anexo V, Directiva Quadro da Água).**

ESTADO EXCELENTE	ESTADO BOM	ESTADO RAZOÁVEL
A composição taxonómica e a abundância do fitoplâncton correspondem totalmente ou quase às que se verificam em condições não perturbadas.	Ligeiras modificações da composição e abundância dos <i>taxa</i> fitoplanctónicos em comparação com as comunidades específicas do tipo. Estas modificações não indicam um crescimento acelerado de algas que dê origem a perturbações indesejáveis do equilíbrio dos organismos presentes na massa de água ou da qualidade físico-química da água ou dos sedimentos.	A composição e abundância dos <i>taxa</i> planctónicos diferem moderadamente das comunidades específicas do tipo.
A biomassa média do fitoplâncton é coerente com as condições físico-químicas específicas do tipo e não é de molde a alterar significativamente as condições de transparência específicas do tipo.		A biomassa é moderadamente perturbada e pode ser de molde a produzir perturbações indesejáveis e significativas dos valores de outros elementos de qualidade biológica e de qualidade físico-química da água ou dos sedimentos.
Os <i>blooms</i> fitoplanctónicos ocorrem com uma frequência e intensidade coerentes com as condições físico-químicas específicas do tipo.	Pode verificar-se um ligeiro aumento da frequência e intensidade dos <i>blooms</i> fitoplanctónicos específicos do tipo.	Pode verificar-se um aumento moderado da frequência e intensidade dos <i>blooms</i> fitoplanctónicos. Podem ocorrer <i>blooms</i> persistentes durante os meses de Verão.

### 2.3. ÍNDICES DE QUALIDADE

Na actualidade existem diversas métricas e índices para avaliar a qualidade de lagos e albufeiras com base no elemento biológico fitoplâncton e que permitem relacionar a produção primária ou as associações de algas e cianobactérias com as condições ambientais, nomeadamente o nível de degradação do lago ou albufeira (Hörnström, 1981; OCDE, 1982; Sládecek, 1973; Brettum, 1989; Barbe *et al*, 1990; Tremel, 1996; Reynolds *et al*, 2002; Brettum & Andersen, 2005, Carvalho *et al*, 2007). Estes instrumentos de avaliação da qualidade baseiam-se em dados de biomassa ou dados de composição, abundância e biovolume fitoplanctónico.

### 2.3.1. BIOMASSA FITOPLANCTÓNICA

A biomassa fitoplanctónica pode ser determinada directamente a partir de contagens (células/ml) e do cálculo do biovolume celular ( $\text{mm}^3/\text{l}$ ) ou indirectamente através da concentração de pigmentos fotossintéticos. No trabalho desenvolvido pelo Grupo Geográfico de Intercalibração Mediterrâneo no âmbito do Exercício de Intercalibração (Decisão da Comissão 2008/915/CE, de 30 de Outubro), foram aplicadas as métricas **Concentração de Clorofila a** ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ) e **Biovolume Total** ( $\text{mm}^3/\text{l}$ ) (Decisão da Comissão 2008/915/CE).

### 2.3.2. COMPOSIÇÃO E ABUNDÂNCIA

Para a análise da composição e abundância da comunidade fitoplanctónica os organismos são identificados até a um nível taxonómico previamente estabelecido, contados (células/ml) e calculado o biovolume ( $\text{mm}^3/\text{l}$ ) de cada *taxon* na amostra. Os dados obtidos são agregados por grupos funcionais e valor indicador de cada *taxon* de fitoplâncton ou utilizados directamente em índices baseados nas abundâncias ou biovolumes.

No âmbito do trabalho desenvolvido pelo Grupo Geográfico de Intercalibração Mediterrâneo no Exercício de Intercalibração (Decisão da Comissão 2008/915/CE, de 30 de Outubro), foram aplicadas as métricas **% de Biovolume de Cianobactérias** e o **Índice de Grupo de Algas (IGA)** (Catalan *et al*, 2003) (Tabela 2). Para o cálculo da métrica **% de Biovolume de Cianobactérias** as espécies de Chroococcales deverão ser excluídas, com excepção dos géneros *Microcystis* e *Woronichinia*. O **IGA** é baseado em proporções de biovolume, atribuindo pesos e comparando grupos de algas e cianobactérias característicos de sistemas eutróficos e grupos associados a ambientes menos produtivos.

Tabela 2 - Constituição e fórmula do Índice de Grupo de Algas (IGA).

Grupo de Algas	Acrónimo
Dinophyceae	<i>D</i>
Chrysophyceae não coloniais	<i>Cnc</i>
Chlorococcales não coloniais	<i>Chnc</i>
Bacillariophyceae não coloniais	<i>Dnc</i>
Cryptophyceae	<i>Cr</i>
Chrysophyceae coloniais	<i>Cc</i>
Bacillariophyceae coloniais	<i>Dc</i>
Chlorococcales coloniais	<i>Chc</i>
Volvocales coloniais	<i>Vc</i>
Cyanobacteria	<i>Cia</i>

$$IGA = \frac{1 + 0,1 \times Cr + Cc + 2 \times (Dc + Chc) + 3 \times Vc + 4 \times Cia}{1 + 2 \times (D + Cnc) + Chnc + Dnc}$$

### 2.3.3. FREQUÊNCIA E INTENSIDADE DE FLORESCÊNCIAS FITOPLANCTÓNICAS

As florescências fitoplanctónicas são usualmente definidas como crescimentos excessivos de algas e cianobactérias (Figura 1) provocados por níveis elevados de nutrientes e condições ambientais favoráveis (e.g. temperatura, luminosidade, estabilidade da coluna de água). Todavia, apenas alguns dos organismos que constituem o fitoplâncton têm capacidade de desenvolver florescências, sendo de destacar as cianobactérias (Figura 2).



**Figura 1 - Florescência superficial de cianobactérias.**



**Figura 2 - Colónias de *Microcystis aeruginosa* e *Microcystis flos-aquae* (ampliação 100x).**

As principais consequências nefastas do desenvolvimento e senescência de florescências são a desoxigenação da água, a alteração das características organolépticas da água e de animais aquáticos que nela vivem e a produção e libertação de toxinas (Vasconcelos & Araújo, 1994).

O Anexo V da Directiva Quadro da Água descreve o papel da intensidade e frequência de florescências fitoplanctónicas na avaliação da qualidade ecológica (Tabela 1). As definições explicitam que, em concordância com as características tipológicas, as florescências podem ocorrer no estado excelente, aumentando a sua frequência e intensidade com o incremento de pressão antropogénica, sobretudo eutrofização. De realçar, que a intensidade das florescências fitoplanctónicas é expressa pela densidade de algas e cianobactérias, conjuntamente com a composição de espécies e respectiva biomassa relativa.

No âmbito do Grupo Europeu de Especialistas em Fitoplâncton (*Phytoplankton Expert Cross-GIG Group*), discute-se actualmente uma definição operacional de florescência fitoplanctónica, a necessidade de avaliar separadamente esta componente do Fitoplâncton e as metodologias de monitorização e métricas de avaliação.

### **3. PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM**

Neste capítulo são estabelecidas orientações e sugeridos procedimentos para a recolha, a preservação, o manuseio e o transporte de amostras de água para análise do elemento de qualidade biológica fitoplâncton e elementos físico-químicos de suporte em sistemas lênticos continentais.

#### **3.1. PERÍODO E FREQUÊNCIA DE AMOSTRAGEM**

Na classificação do estado/potencial ecológico deve ser indicado o nível de precisão, ou seja, a probabilidade da verdadeira classe de qualidade do lago ou albufeira ser distinta do resultado observado. A confiança e precisão da classificação diminui com o acréscimo da incerteza, factor que depende dos erros associados ao processo de amostragem e tratamento das amostras, da conformidade do sistema de classificação e da variabilidade natural espacial, intra-anual e inter-anual do elemento biológico.

A incerteza produzida pelo factor humano pode ser controlada através do estabelecimento de procedimentos sistematizados, formação dos operadores, incremento do nível taxonómico de identificação, intercalibrações laboratoriais e da melhoria contínua do sistema de classificação. Em relação à variabilidade natural, o aumento da precisão pode ser efectuado através da colheita de amostras compostas, do acréscimo do número de estações de amostragem e/ou aumento da frequência de amostragem.

Em estudos de investigação, a amostragem com periodicidade mensal permite alcançar um nível de descrição apropriado da comunidade fitoplanctónica, apesar da frequência ideal ser quinzenal ou mesmo semanal (Reynolds, 1984, 1990). As limitações logísticas e de meios humanos inviabilizam estas frequências de amostragem nos programas de monitorização de qualidade ecológica, salvo em situações pontuais (e.g. monitorização de investigação).

Para a avaliação da qualidade ecológica a frequência de amostragem recomendada para o fitoplâncton é de **6 x ano**, devendo coincidir **1 colheita com cada período sazonal (Outono, Inverno, Primavera) e 3 colheitas com um intervalo mínimo de 3 semanas no período potencialmente crítico (Junho a Setembro)**. A frequência estabelecida permite contemplar a variabilidade sazonal e garante uma precisão aceitável na classificação da qualidade do lago ou da albufeira. De realçar, que após enxurradas deve-se garantir a salvaguarda de 1

semana na amostragem, de modo a evitar valores anormalmente elevados de concentração de nutrientes e turbidez abiogénica,

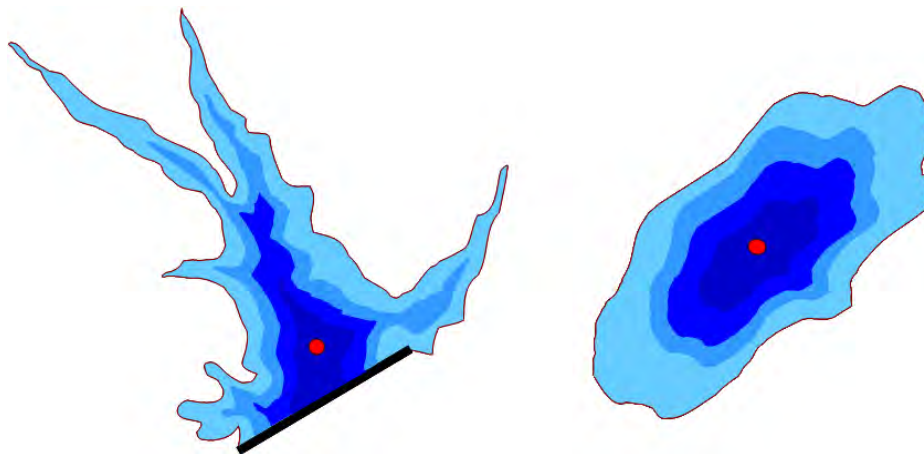
A classificação da qualidade ecológica de um lago ou de uma albufeira deverá ser realizada utilizando, preferencialmente, um conjunto de 3 anos consecutivos de dados de fitoplâncton. Este procedimento permite integrar na classificação a variabilidade hidrológica inter-anual e despistar eventuais observações díspares.

### 3.2. SELECÇÃO DO LOCAL DE AMOSTRAGEM

A selecção das estações de amostragem deve ser efectuada de acordo com a especificidade do elemento biológico, os objectivos da monitorização, as características morfológicas do lago ou da albufeira, como a área do espelho de água e o número de afluentes, o regime de exploração e os recursos disponíveis.

As estações de amostragem para a colheita de amostras para avaliar a qualidade ecológica de lagos e albufeiras devem estar localizadas em zona pelágica e a uma distância razoável da margem, para evitar a presença de algas perifíticas na amostra de fitoplâncton.

Nas albufeiras, uma das estações de amostragem deve estar localizada 300 a 500 metros a montante da barragem, correspondendo esta localização à zona de maior profundidade da albufeira e onde os efeitos da turbulência provocada pelo funcionamento dos órgãos hidráulicos da barragem são desprezáveis. Nos lagos, a estação de amostragem deve estar localizada na zona mais profunda, que geralmente coincide com a área central do lago (Figura 3). As restantes estações de amostragens, caso existam, devem ser distribuídas pela área do espelho de água de acordo com as suas especificidades e de modo a integrar a variabilidade espacial da massa de água na avaliação da qualidade ecológica.



**Figura 3 - Localização da estação de amostragem (a vermelho) em albufeiras ou lagos, no caso da amostragem ser efectuada num único sítio.**

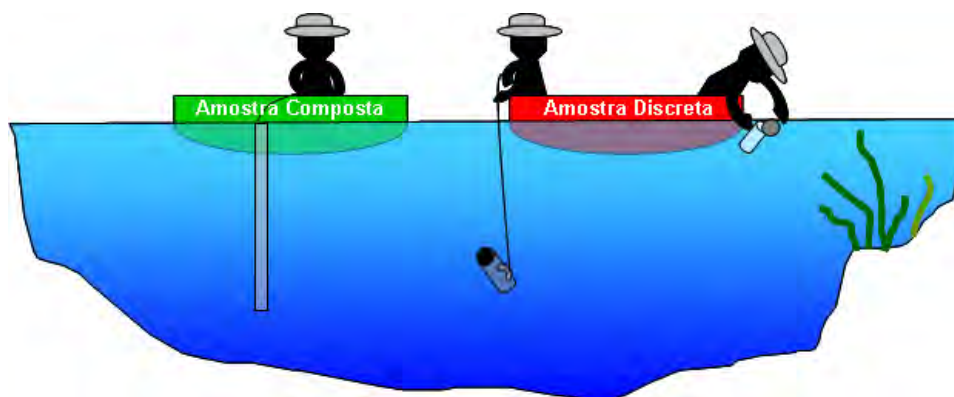
Os dados obtidos através da análise da comunidade fitoplanctónica têm um valor limitado caso não sejam acompanhados de informação físico-química e hidromorfológica de suporte. Deste modo, a colheita de amostras de fitoplâncton deverá coincidir com a medição *in situ* de parâmetros físico-químicos (e.g. temperatura, condutividade, pH, oxigénio dissolvido) e recolha de amostras de água para a determinação de outros parâmetros físico-químicos (e.g. nutrientes, alcalinidade).

As estações de amostragem devem ser identificadas com um código e a sua localização registada com o auxílio do GPS. As coordenadas geográficas das estações de amostragem serão utilizadas em posteriores campanhas, de forma a garantir a colheita de amostras numa localização semelhante.

### 3.3. TIPOS DE AMOSTRA

O tipo de amostra a recolher varia em função dos objectivos definidos para o programa de monitorização. No presente protocolo são descritos procedimentos para a obtenção de amostras compostas (mistura discreta ou contínua) com o objectivo de avaliar a qualidade ecológica de lagos e albufeiras.

As amostras pontuais são amostras discretas colhidas à superfície da água, no fundo ou a profundidades pré-definidas. As amostras compostas são amostras obtidas em contínuo na coluna de água ou através da mistura de uma série de amostras discretas colhidas a diferentes profundidades, em proporções de mistura adequadas e conhecidas (Figura 4).



**Figura 4 - Colheita de amostras compostas e de amostras discretas.**

O acompanhamento ou despiste de situações de risco para a saúde pública, como a presença de florescências fitoplanctónicas potencialmente tóxicas em praias fluviais ou junto a pontos de captação de água para consumo humano, pode ser monitorizado recorrendo a amostras discretas colhidas nos locais e profundidades adequados.

### 3.4. EQUIPA DE AMOSTRAGEM E MATERIAL

Para a obtenção de amostras para a análise qualitativa e quantitativa de fitoplâncton e classificação da qualidade ecológica, a equipa de amostragem deve ser constituída por 2 ou 3 operadores com formação e experiência nos procedimentos de amostragem. O material necessário para obter este tipo de amostras é, como orientação, seguidamente discriminado:

#### Geral

- Mapas
- Barco (Motor a 4 tempos ou eléctrico)
- Fateixa/âncora
- Corda
- Sistema de Posicionamento Global (GPS)
- Câmara fotográfica digital

#### Protecção Pessoal

- Vestuário e calçado apropriado
- Coletes salva-vidas
- Luvas

#### Recolha de amostras

- Folhas de registo (Ficha de Campo), incluindo base e lápis
- Disco de *Secchi* (20 cm de diâmetro, quadrantes alternados branco com preto) com cabo marcado metro a metro (Figura 5)
- Sonda multiparamétrica com sensores de temperatura, condutividade, pH, oxigénio dissolvido e cabo marcado metro a metro e com extensão suficiente para abranger toda a coluna de água
- Garrafa hidrográfica ou equipamento de recolha automática de amostras compostas<sup>1</sup> (Figura 6)
- Garrafão graduado para a homogeneização da amostra composta
- Termos ou garrafas opacas de polietileno (1 ou 2 l) (análise de pigmentos e físico-químicos)
- Frascos transparentes<sup>2</sup> (250 ou 500 ml) (identificação/contagens fitoplâncton)
- Fixador/conservante (Solução de Lugol)
- Parafilme
- Mala térmica e termoacumuladores
- Material de etiquetagem

<sup>1</sup> Existem diversos tipos de garrafas hidrográficas (e.g. Van Dorn, Nasen, Niskin) e equipamentos de recolha automática de amostras compostas que podem ser utilizados (e.g. *Integrating WaterSampler* da Hydro-Bios, amostrador integral da UWITEC)

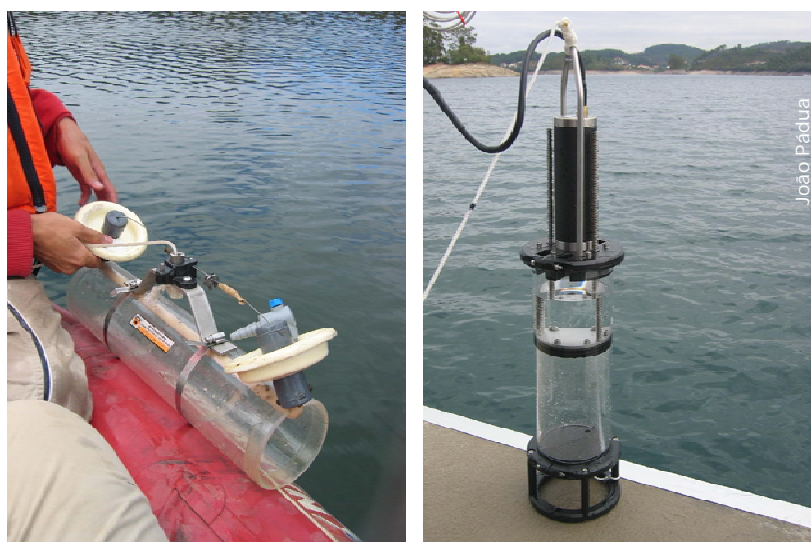
<sup>2</sup> Os frascos transparentes, preferencialmente de vidro, não deverão reagir nem ser permeáveis aos fixadores/conservantes. É desaconselhável a utilização de garrafas de polietileno (PE) que absorvem o iodo contido na solução de Lugol.





**Figura 5 - Disco de Secchi.**

As folhas de registo (Ficha de Campo) devem ser objectivas e funcionais, de modo a facilitar a sua leitura e preenchimento. A ficha deve ter campos para a identificação da massa de água e estação de monitorização, data e hora de amostragem e nome do técnico responsável. Outros registos úteis são as condições meteorológicas, o nível e o aspecto da água. Para a amostragem a ficha deve apresentar uma grelha para o registo dos perfis de temperatura e oxigénio dissolvido e campos para os valores de condutividade, pH, profundidade de Secchi, profundidade da zona eufótica e profundidade máxima do epilímnio. Deve ter um campo reservado às características da amostra colhida, volume armazenado para cada valência laboratorial e o respectivo código de identificação. Por fim, deve integrar uma secção de controlo de qualidade que assegure o preenchimento e validação de todos os campos da ficha. No Anexo I é sugerida uma ficha de campo.



**Figura 6 - Garrafa hidrográfica tipo Van Dorn e equipamento de recolha automática de amostras compostas (Hydro-Bios).**

Para a recolha de amostras pontuais discretas, a constituição da equipa e o material de campo necessário depende da localização e estratégia de amostragem.

### 3.5. AMOSTRAGEM

Neste protocolo são descritos procedimentos para a obtenção de amostras compostas contínuas ou amostras compostas pela mistura de uma série de amostras discretas colhidas a diferentes profundidades, em proporções de mistura adequadas e conhecidas.

O volume colhido de amostra deve ser adequado às especificações laboratoriais de cada determinação ou análise: concentração de pigmentos, análise preliminar da composição fitoplanctónica em amostra *in vivo* e análise da composição e contagem do fitoplâncton em amostra fixada/conservada. As amostras para a determinação dos elementos físico-químicos de suporte (e.g. nutrientes) devem ser retiradas da mesma amostra composta colhida para a análise do fitoplâncton<sup>3</sup>. A excepção ocorre quando a profundidade da zona eufótica atinge um hipolímnio que apresenta depleção de oxigénio e formação de sulfureto de hidrogénio. Nesta situação, uma amostra composta do epilímnio deve ser colhida para a determinação laboratorial dos elementos físico-químicos de suporte.

De realçar a importância de obter, para além dos perfis de temperatura e oxigénio dissolvido e da amostra composta de zona eufótica, outra informação físico-química da coluna de água (e.g. fósforo total, amónia). No caso de massas de água profundas é aconselhável a colheita de amostras para a determinação destes parâmetros na cota intermédia/termoclina e junto ao fundo (aproximadamente a 1 metro dos sedimentos). Nas massas de água menos profundas, este procedimento poderá ser efectuado apenas no fundo.

Os procedimentos descritos devem ser efectuados de acordo com as normas de segurança apropriadas e apenas após o barco se encontrar estabilizado na estação de amostragem. Caso o laboratório não disponha de procedimentos de controlo de qualidade do material de amostragem, os recipientes de recolha e armazenamento de amostras deverão ser previamente lavados com água da albufeira a monitorizar.

#### **Procedimentos orientadores de campo:**

1. Preencher o cabeçalho da ficha de campo;
2. Com sonda simples/multiparamétrica, registar os perfis<sup>4</sup> de temperatura (°C), % e oxigénio dissolvido (mg/l) e, se possível, pH e condutividade (µS/cm);

---

<sup>3</sup> Caso sejam utilizados 2 l de amostra para a determinação da clorofila *a*, 0,5 l para a amostra de fitoplâncton *in vivo*, 0,5 l para a amostra fixada com Lugol e 2 l para a determinação da concentração dos nutrientes, o volume de amostra necessário é de 5 l. Adicionalmente, deve ser recolhido 1 ou 2 l de amostra como reserva.

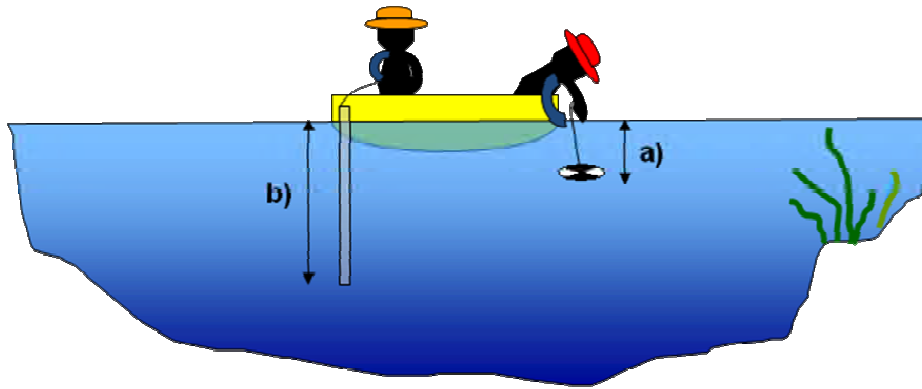
<sup>4</sup> Os perfis devem ser efectuados metro a metro nos primeiros 20 metros, de 2 em 2 metros nos 20 metros seguintes e de 5 em 5 metros nos restantes. Sempre que sejam detectadas alterações significativas, o espaçamento das medições será apertado para um intervalo de metro a metro.

3. Analisar o perfil de temperatura e, caso seja detectado o padrão de estratificação térmica, registar a profundidade máxima do epilimnio;
4. Do lado do barco com sombra, medir a transparência utilizando o disco de *Secchi*. Registar a profundidade (m) a que desaparece e aparece o disco de *Secchi*, considerando-se a média das leituras uma estimativa da transparência;
5. Estimar a profundidade da zona eufótica<sup>5</sup> ( $2,5 \times$  Profundidade de *Secchi*) (Figura 7). O valor obtido corresponde à profundidade definida como o limite da amostra composta;
6. Com o **equipamento de recolha automática de amostras compostas** obter uma amostra desde a superfície até à profundidade definida **ou** com a **garrafa hidrográfica** colher e colocar no garrafão graduado igual volume de cada amostra discreta reconstituindo um perfil vertical, de metro a metro, desde a superfície até à profundidade definida como limite da zona eufótica;
7. Homogeneizar a amostra composta, garantindo a obtenção de um volume adequado para realizar as análises requeridas e a sua eventual repetição;
8. Distribuir a amostra homogeneizada por termos/garrafas opacas de polietileno e por 2 frascos transparentes;
9. Adicionar fixador/conservante à amostra contida num dos frascos transparentes;
10. Etiquetar os termos/garrafas opacas de polietileno e os frascos transparentes;
11. Fechar bem, se necessário com parafilme, e armazenar os termos/garrafas opacas de polietileno e os frascos na mala térmica (4 a 10°C);
12. Terminar o preenchimento da ficha de campo;
13. Transportar as amostras para o laboratório, preferencialmente no próprio dia da amostragem e tomando todas as precauções para assegurar a integridade da amostra entre a colheita e a análise;

Os termos/garrafas opacas de polietileno e os frascos para acondicionar as amostras para a análise do fitoplâncton devem ser herméticos e preenchidos até cerca de 90% da sua capacidade, de modo a permitir a posterior homogeneização da amostra.

---

<sup>5</sup> A zona eufótica prolonga-se por 2 a 3 vezes a profundidade de Secchi, o que corresponde à profundidade à qual a luz solar é atenuada para 0,5%, sendo este o valor mínimo de luz requerido para realizar fotossíntese (Fee, 1978). O valor de  $2,5 \times$  profundidade de Secchi foi o adoptado e utilizado no Exercício de Intercalibração como limite inferior da zona eufótica.



**Figura 7 - Medição da profundidade de Secchi (a) e estimativa da profundidade da zona eufótica (2,5 x profundidade de Secchi) (b).**

### ■ Normas de segurança

A amostragem de fitoplâncton deve ser efectuada por equipas com um mínimo de duas pessoas. Os técnicos de amostragem devem utilizar calçado e vestuário adequado, assim como colete salva-vidas. Por motivos de segurança, em massas de água que se suspeite estarem contaminadas, a amostragem deve ser efectuada com luvas de borracha. Esta norma visa proteger as mãos de eventuais ferimentos, para além de prevenir problemas de saúde resultantes do contacto directo com águas contaminadas. É aconselhável, no final, proceder à desinfeção das mãos.

## 3.6. PRESERVAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

### 3.6.1. PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS

A amostra a utilizar para a identificação e contagens do fitoplâncton, armazenada num dos frascos transparentes, deve ser rapidamente fixada/conservada com a adição de solução de Lugol na razão de 0,5 ml por cada 100 ml de amostra (Lund *et al.*, 1958). No final, a amostra deve adquirir uma cor mel, sendo de realçar que o volume de solução Lugol citado é meramente indicativo e varia de acordo com a quantidade de matéria orgânica e de outros redutores presentes na amostra<sup>6</sup>.

#### Fixadores/Conservantes

A solução de Lugol pode ser adquirida ou então preparada em laboratório através de 2 processos:

#### ■ Solução ácida de Lugol (Willén, 1962):

Dissolver 100 g de KI (iodeto de potássio) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada; adicionar 50 g de cristais de iodo e agitar até se dissolverem; adicionar 100 g de ácido acético glacial; assim que a solução estiver próxima da saturação deve ser decantada para eliminar os possíveis precipitados.

<sup>6</sup> Em águas oligo-mesotróficas a adição de 0,2 ml de solução de Lugol pode ser suficiente para preservar a amostra, evitando a sobre-saturação que pode dificultar a identificação do fitoplâncton.

■ Solução alcalina de Lugol (Utermöhl 1958 modificada):

Dissolver 100 g de KI (iodeto de potássio) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada; adicionar 50 g de cristais de iodo e agitar até se dissolverem; adicionar 100 g de acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COO-Na); assim que a solução estiver próxima da saturação deve ser decantada para eliminar os possíveis precipitados.

A solução resultante deve estar fortemente corada e deve ser conservada num recipiente hermético e escuro, ou protegido da luz, de modo a minimizar a sublimação.

### 3.6.2. IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS

Os recipientes que contêm as amostras devem ser identificados com informação relevante e clara, utilizando tinta e etiquetas resistentes à água. A seguinte informação poderá ser indicada na etiqueta:

- Nome do Lago ou da Albufeira;
- Código da Estação de Amostragem;
- Data de Amostragem (aaaa-mm-dd);
- Código da Amostra;
- Parâmetro (e.g. clorofila *a*, fitoplâncton *in vivo*);
- Descrição da Amostra (e.g. Contínua-0 a 8m; Discreta-8 amostras, 0 a 7m);
- Identificação do Técnico de Amostragem;
- Entidade Responsável pela Recolha.

### 3.6.3. ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

As amostras obtidas para a análise dos pigmentos devem ser mantidas no frio (4 a 10°C) e no escuro até serem filtradas. A filtração deve ser efectuada no período de 24 horas após a colheita.

As amostras fixadas/conservadas com solução de Lugol devem ser armazenadas em local escuro e frio (1 a 4°C) por um período máximo de 12 meses. Caso a análise seja efectuada num prazo de 3 semanas, as amostras podem ser armazenadas no escuro à temperatura ambiente. As amostras fixadas/conservadas devem ser periodicamente examinadas, adicionando solução de Lugol em caso de perda de cor devido à oxidação do reagente fixador.

As amostras *in vivo* utilizadas para a análise preliminar da composição fitoplanctónica devem ser mantidas no escuro e a uma temperatura entre os 4 e os 10°C. O processamento da amostra deve ser realizado no período de 36 horas após

a colheita. Se necessário e de forma a prevenir a sua degradação, pode ser efectuada uma diluição das amostras que aparentem densidades elevadas de organismos ou abundante matéria orgânica.

## **4. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS - ANÁLISE DE PIGMENTOS**

No fitoplâncton existem diversos pigmentos fotossintéticos, como as clorofilas *a*, *b* e *c*, os carotenos, as xantofilas e as ficobilinas. A clorofila *a* é o principal pigmento fotossintético de todos os organismos que realizam fotossíntese com libertação de oxigénio, sendo amplamente utilizada para estimar a biomassa fitoplanctónica nas águas doces superficiais.

A determinação da concentração da clorofila *a* pode ser efectuada recorrendo a três métodos: espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Neste protocolo é descrito um método espectrofotométrico, do qual constam as seguintes secções: equipamento, material e reagentes; filtração e conservação, extracção dos pigmentos e determinação espectrofotométrica da concentração dos pigmentos. Recomenda-se o uso de procedimentos baseados em Normas Internacionais e validada a sua implementação e os Limites de Quantificação.

Os procedimentos orientadores seguidamente descritos são baseados nas normas NP 4327: 1996 e EN ISO 10260:1992, no *Standard Methods* 10200H (APHA, 1999), nos procedimentos utilizados no Exercício de Intercalibração e nos protocolos adoptados/desenvolvidos pelas Comissões de Coordenação e Desenvolvimento Regional (CCDRs) e Agência Portuguesa do Ambiente (APA).

### **4.1. EQUIPAMENTO, MATERIAL E REAGENTES**

#### **Equipamento**

- Bomba de vácuo com manómetro
- Rampa de filtração (Figura 8)
- Espectrofotómetro com largura de banda inferior ou igual a 2,0 nm
- *Cuvettes* espectrofotométricas de percurso óptico de 1 cm ou de maior percurso óptico
- Centrífuga
- Ficha de laboratório (exemplo de ficha no Anexo II).

#### **Material**

- Balões volumétricos (100 ml e 1000 ml)
- Provetas de vidro graduadas
- Filtros de fibra de vidro (e.g. Whatman GF/C de 1,2 µm de porosidade nominal)
- Pinça de pontas lisas e chatas
- Varetas de vidro

- Tubos de centrifuga de 15 ml de capacidade, com rolha, resistentes a solventes orgânicos
- Pipetas de vidro (1, 5 e 10 ml) e/ou dispensador de volume fixo (5 ml)
- Micropipetas de volume variável (25-250  $\mu$ l e 0,5-5 ml)
- Pontas descartáveis de micropipetas
- Cronómetro
- Papel de Alumínio
- Etiquetas
- Caixa de plástico opaca e vedada

### 🧪 Reagentes

- Solução Aquosa de Acetona a 90% (v/v):

Adicionar num balão volumétrico de 100 ml, 90 ml de acetona pró-análise e 10 ml de água destilada ou equivalente (medidos em proveta graduada). Homogeneizar a solução e guardar em frasco de vidro vedado.

- Solução de Ácido Clorídrico (HCl) 0,1 N:

Sempre que possível, utilizar ampolas de titrisol 0,1 N para a preparação da solução de Ácido Clorídrico (HCl) 0,1 N. Alternativamente, medir 8,5 ml de ácido clorídrico concentrado (HCl) e transferir para balão volumétrico de 1000 ml contendo 500 ml de água destilada. Deixar arrefecer e adicionar água destilada até perfazer os 1000 ml. Homogeneizar a solução e guardar em frasco escuro vedado.



**Figura 8 - Rampa de filtração.**



#### 4.2. FILTRAÇÃO E CONSERVAÇÃO

1. Colocar o filtro de fibra de vidro no suporte de filtração com o auxílio da pinça;
2. Homogeneizar a amostra, agitando cuidadosamente as garrafas opacas de polietileno;
3. Filtrar um volume conhecido de amostra (2 ou 3 replicados por amostra) através do filtro, com o auxílio da rampa de filtração e da bomba de vácuo. Evitar colmatar o filtro<sup>7</sup>, não exceder os 10 minutos e manter a pressão de filtração inferior aos 50 mmHg de modo a prevenir a destruição das células fitoplanctónicas;
4. Retirar o filtro com o auxílio da pinça e, sobre papel de filtro, dobrar e enxugar os filtros;
5. Proceder de imediato à extracção dos pigmentos ou, caso contrário, embrulhar os filtros em folha de alumínio devidamente identificada (código da amostra, código da estação de amostragem, nome do lago ou albufeira, data e volume filtrado);
6. Colocar as amostras embrulhadas em folha de alumínio numa caixa hermética de plástico opaco e armazenar no escuro e no frio. Um filtro pode ser conservado durante alguns dias a 5°C ou durante 1 mês a -20°C.

#### 4.3. EXTRACÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO

1. Introduzir os filtros nos respectivos tubos de centrífuga de 15 ml, que devem ser identificados (e.g. número ou letra) e envoltos em papel de alumínio;
2. Adicionar a cada tubo 5 ml de acetona a 90%<sup>8</sup>, utilizando uma pipeta/micropipeta ou o dispensador. Macerar o filtro;
3. Adicionar a cada tubo 5 ml de acetona a 90%, utilizando uma pipeta/micropipeta ou o dispensador.
4. Colocar num tubo de centrífuga 10 ml acetona a 90%, esta amostra será processada de forma idêntica às restantes e funcionará como branco espectrofotométrico. Centrifugar durante aproximadamente 20 minutos a 3000/4000 rpm;
5. Realizar a leitura espectrofotométrica do extracto imediatamente após a centrifugação.

---

<sup>7</sup> Em águas com quantidades elevadas de matéria orgânica em suspensão é aconselhável passar a amostra por uma rede de nylon (malha entre 200 e 300 µm) e filtrar pequenos volumes de amostra em diferentes filtros, os quais serão sujeitos ao processo de extracção dos pigmentos de forma conjunta.

<sup>8</sup> A manipulação do solvente acetona deve ser efectuada em sala bem ventilada ou em Hotte.

#### 4.4. LEITURA ESPECTROFOTOMÉTRICA

A determinação espectrofotométrica da concentração de pigmentos fotossintéticos, nomeadamente da clorofila *a*, pode ser efectuada utilizando duas equações: monocromática de Lorenzen (1967) ou tricromática de Jeffrey & Humphrey (1975).

Convém realçar que todo o procedimento deve ser efectuado em ambiente com luz ténue e sempre com os tubos com o extracto devidamente protegidos da luz. As leituras espectrofotométricas devem ser realizadas de forma célere para evitar a evaporação da acetona e a conseqüente variação do volume do extracto. Em rotina, as células do espectrofotómetro devem ser lavadas com água destilada e acetona a 90%, e ocasionalmente com ácido clorídrico (HCl 0,1 N), água destilada e acetona a 90%.

#### Equações Tricromáticas de Jeffrey & Humphrey (1975) - Determinação da Clorofila *a*, *b* e *c*

1. Transferir 3 ml do extracto da amostra do tubo de centrifuga para a *cuvette* de 1 cm pipetando cuidadosamente;
2. Medir a absorvância do extracto da amostra a 750 nm, 664 nm, 647 nm e 630 nm, contra o branco de acetona a 90%;
3. Calcular as concentrações de clorofila *a*, *b* e *c* de acordo com as equações de Jeffrey & Humphrey (1975):

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/m}^3\text{)} = [11,85 (A_{664}-A_{750}) - 1,54 (A_{647}-A_{750}) - 0,08 (A_{630}-A_{750})] \times V_1 / (V_2 \times I)$$

$$\text{Clorofila } b \text{ (mg/m}^3\text{)} = [-5,43 (A_{664}-A_{750}) + 21,03 (A_{647}-A_{750}) - 2,66 (A_{630}-A_{750})] \times V_1 / (V_2 \times I)$$

$$\text{Clorofila } c \text{ (mg/m}^3\text{)} = [-1,67 (A_{664}-A_{750}) - 7,60 (A_{647}-A_{750}) + 24,52 (A_{630}-A_{750})] \times V_1 / (V_2 \times I)$$

<b>A<sub>630</sub></b>	Absorvância a 630 nm
<b>A<sub>647</sub></b>	Absorvância a 647 nm
<b>A<sub>664</sub></b>	Absorvância a 664 nm
<b>A<sub>750</sub></b>	Absorvância a 750 nm, correcção para a turbidez
<b>V<sub>1</sub></b>	Volume de acetona a 90% utilizado na extracção (ml)
<b>V<sub>2</sub></b>	Volume da amostra filtrada (l)
<b>I</b>	Percurso óptico da célula do espectrofotómetro (cm)

## Equações Monocromáticas de Lorenzen (1967) - Determinação da Clorofila *a* e de Feopigmentos

Os produtos da degradação da clorofila, designados por feopigmentos, têm uma estrutura molecular similar à clorofila, com excepção da perda do magnésio da estrutura anelar da molécula e/ou da cadeia fitol. Os feopigmentos absorvem, com menor capacidade, luz no mesmo comprimento de onda que a clorofila. A acidificação incluída no método monocromático promove a degradação da clorofila em feopigmentos, o que permite corrigir os valores de concentração de clorofila *a* dos erros devido à presença de feopigmentos.

1. Transferir 3 ml do extracto da amostra do tubo de centrifuga para a *cuvette* de 1 cm pipetando cuidadosamente;
2. Medir a absorvância do extracto da amostra a 750 nm e a 665 nm, contra o branco de acetona a 90%;
3. Adicionar 100 µl de ácido clorídrico (HCl 0,1 N) na *cuvette* e misturar cuidadosamente;
4. Esperar 1 minuto;
5. Medir, outra vez, a absorvância do extracto da amostra a 750 nm e a 665 nm, contra o branco de acetona a 90%;
6. Calcular as concentrações de clorofila *a* e feopigmentos de acordo com as equações de Lorenzen (1967):

$$\text{Clorofila } a \text{ (mg/m}^3\text{)} = 11,4 \times K \times [(A_{665} - A_{750}) - (A_{665A} - A_{750A})] \times V_1 / (V_2 \times I)$$

$$\text{Feopigmentos (mg/m}^3\text{)} = 11,4 \times K \times [R \times (A_{665A} - A_{750A}) - (A_{665} - A_{750})] \times V_1 / (V_2 \times I)$$

<b>A<sub>665</sub></b>	Absorvância a 665 nm antes da acidificação
<b>A<sub>665A</sub></b>	Absorvância a 665 nm após a acidificação
<b>A<sub>750</sub></b>	Absorvância a 750 nm antes da acidificação
<b>A<sub>750A</sub></b>	Absorvância a 750 nm após a acidificação
<b>K</b>	Factor que equaciona a redução da absorvância na concentração inicial de clorofila <i>a</i> após acidificação = R/(R-1) = 2,43
<b>R</b>	Razão máxima de absorvância de A <sub>665</sub> / A <sub>665A</sub> na ausência de feopigmentos (= 1,7)
<b>V<sub>1</sub></b>	Volume de acetona a 90% utilizado na extracção (ml)
<b>V<sub>2</sub></b>	Volume da amostra filtrada (l)
<b>I</b>	Percurso óptico da célula do espectrofotómetro (cm)

## 5. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS – IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM

A análise quantitativa do fitoplâncton consiste na identificação, contagem e no cálculo do biovolume dos organismos pertencentes a cada *taxon* num determinado volume da amostra recolhida.

A utilização do microscópio é obrigatória para a observação da maioria dos organismos fitoplanctónicos, o que exige diversos procedimentos prévios de preparação da amostra para a sua correcta visualização. A análise quantitativa pode ser efectuada recorrendo a diferentes tipos de microscópios ópticos: o microscópio óptico composto, o microscópio de inversão e o microscópio de epifluorescência. O presente protocolo descreve o método de Utermöhl (1958), efectuado em microscópio de inversão e utilizando câmaras de sedimentação.

O método descrito é adequado para obter informação sobre a composição, abundância e biomassa (biovolume) do fitoplâncton em lagos e albufeiras. Os procedimentos enumerados são baseados na norma EN 15204:2006, no *Standard Methods* 10200F e 10200I (APHA, 1999), nos procedimentos utilizados no Exercício de Intercalibração e nos protocolos adoptados/desenvolvidos por equipas de investigação de universidades portuguesas e pelo Laboratório de Referência da Agência Portuguesa do Ambiente (APA).

### 5.1. EQUIPAMENTO, MATERIAL E REAGENTES

#### **Equipamento**

- Microscópio de Inversão (Figura 9);
- Câmara digital acoplada ao microscópio (facultativo);
- Câmaras de sedimentação (câmaras de Utermöhl) de 2,5 a 100 ml de volume (Figura 11);
- Fotografias, guias e chaves de identificação;
- Fichas de laboratório (exemplo de ficha no Anexo II).

#### **Material**

- Esguicho;
- Pipeta calibrada;
- Pompete;
- Balões e provetas de vidro graduadas;
- Pipetas de Pasteur.

## 🧪 Reagentes

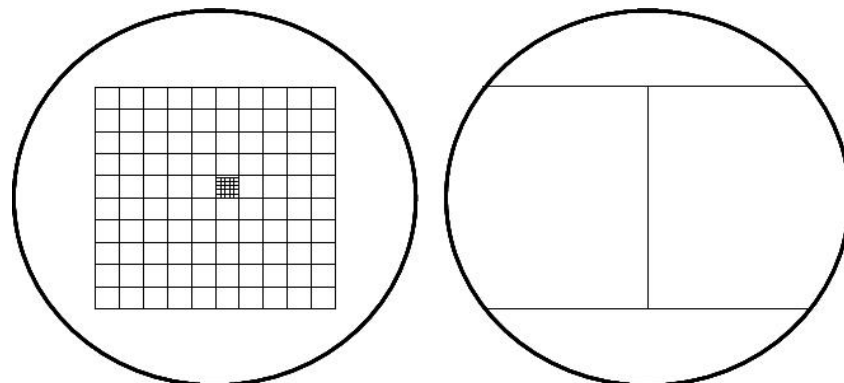
- Água destilada ou equivalente;
- Óleo de imersão para as objectivas;
- Pasta de silicone.



**Figura 9 - Microscópio de inversão.**

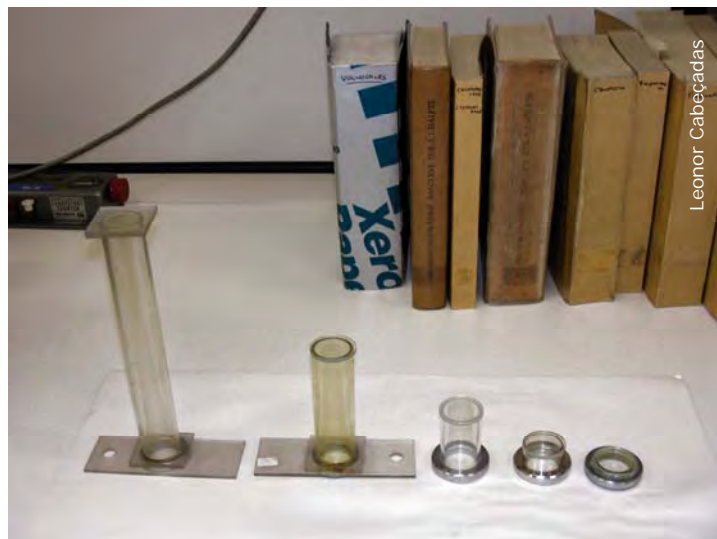
O **microscópio** deve ser binocular de inversão com contraste de fase ou contraste diferencial (Nomarski) e equipado com:

- condensador de abertura numérica mínima de 0,5;
- oculares de ampliação 10× ou 12,5×, uma de contagem (e.g. ocular de traços móveis, com retículo calibrado) (Figura 10) e outra com um micrómetro calibrado;
- objectivas de 10×, 20×, 40× e objectiva de imersão de 100×.



**Figura 10 - Ocular com retículo (esquerda) e ocular de traços móveis (direita).**

A **câmara de sedimentação** consiste numa coluna vertical com uma base através da qual o seu conteúdo pode ser observado com o microscópio de inversão. A coluna, de volume variável, é preenchida com a amostra permitindo que as partículas sedimentem no fundo da câmara devido à força gravítica. A câmara pode ser simples, uma única peça, ou composta por uma coluna superior e uma base com rosca ou encaixe. A espessura do fundo da câmara de sedimentação afecta directamente a qualidade da imagem, pelo que deve ser inferior a 0,17 mm.



**Figura 11 - Câmaras de sedimentação. Duas câmaras compostas (esquerda) e três câmaras simples (direita).**

## 5.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A adequada preparação da amostra é essencial para a obtenção de uma distribuição aleatória dos organismos fitoplanctónicos depositados no fundo da coluna de sedimentação, sendo este padrão exigido para a realização de análises quantitativas através da aplicação de estratégias de contagem uniformes e métodos estatísticos.

A preparação da amostra seguidamente descrita deve ser efectuada para amostras *in vivo* e amostras preservadas com Lugol e engloba a aclimação, a homogeneização e a sedimentação.

1. Preencher o cabeçalho da ficha de laboratório;
2. Submeter todo o material, incluindo as amostras (frascos transparentes) e as câmaras de sedimentação, a um período de aclimação à temperatura ambiente durante, pelo menos, 12 horas;

3. Homogeneizar manualmente a amostra, através de suaves movimentos circulares horizontais e verticais do frasco durante cerca de 2 minutos;
4. Escolher a câmara de sedimentação apropriada<sup>9</sup> e, se necessário, diluir ou concentrar a amostra<sup>10</sup>;
5. Preencher cuidadosamente o volume total da câmara de sedimentação, se possível numa única adição, evitando a formação de bolhas de ar. Este procedimento pode ser efectuado directamente da garrafa ou utilizando uma pipeta com abertura de ponta de 2 a 3 mm;
6. Tapar a coluna de sedimentação com a peça de vidro/cristal<sup>11</sup>, evitando a formação de bolhas de ar;
7. Colocar uma nota junto à câmara de sedimentação com o volume de amostra, o código da estação de amostragem e a data;
8. Conservar a câmara de sedimentação numa superfície nivelada durante 24 horas, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. O tempo de sedimentação recomendado é de 4 horas por centímetro de altura da coluna de sedimentação;
9. Para câmaras compostas (50 ou 100 ml), retira-se a coluna de água fazendo-a deslizar de modo a eliminar o sobrenadante. Cuidadosamente cobre-se o fundo ( $\pm 2$  ml) que contém o sedimento com uma lamela. Esta operação deve ser realizada cuidadosamente para evitar a formação de bolhas de ar;
10. Transferir cuidadosamente a câmara de contagem para o microscópio;
11. Com a ampliação menor, verificar se a distribuição das partículas é aleatória<sup>12</sup> e se o número de algas e cianobactérias por campo de contagem permite uma correcta identificação e contagem. Se a densidade de algas e cianobactérias por campo de contagem for muito baixa, extremamente elevada ou a distribuição não for aleatória, a amostra é rejeitada e é processada uma nova amostra.

As câmaras de sedimentação devem ser limpas e secas entre utilizações. A limpeza inclui lavagem com água e detergente ou limpeza com metanol, etanol (90%), acetona, isopropanol, seguida de passagem por água destilada.

<sup>9</sup> A escolha da câmara de sedimentação depende da densidade do fitoplâncton. Quanto maior a densidade menor o volume necessário (e.g. em água oligotróficas pode ser necessário um volume de 100 ml de amostra enquanto que em águas eutróficas os 2,5 ml podem ser adequados).

<sup>10</sup> Para assegurar uma distribuição adequada das partículas pode ser necessário diluir a amostra, se a densidade de algas for elevada, ou concentrar a amostra deixando sedimentar as partículas e retirando o sobrenadante, se a densidade de algas for reduzida.

<sup>11</sup> Se a amostra contiver partículas que manifestem resistência ao processo de sedimentação, podem ser adicionadas umas gotas de detergente ou ácido acético glacial antes de tapar a coluna de sedimentação.

<sup>12</sup> O padrão de distribuição requerido para a quantificação fitoplanctónica é o aleatório, reconhecido pelo padrão irregular e com ocasionais espaços sem partículas. Esta hipótese pode ser estatisticamente testada contando um *taxon* na totalidade e aplicando um teste  $\chi^2$ .

### 5.3. IDENTIFICAÇÃO E CONTAGEM

O processo de contagem envolve a identificação e registo do número de indivíduos de cada *taxon* observados numa área conhecida da câmara. A densidade de cada *taxon* pode ser estimada, extrapolando os valores obtidos para a área de toda a câmara e para o volume de amostra analisado.

As análises microscópicas de fitoplâncton são tecnicamente exigentes, morosas e caras, pelo que é importante otimizar a estratégia de identificação e contagem e as opções tomadas ao longo do processo de quantificação. A escolha da estratégia de quantificação depende dos objectivos do estudo, da densidade de algas e cianobactérias e do nível taxonómico exigido.

#### 5.3.1. IDENTIFICAÇÃO

Antes da contagem dos organismos presentes na amostra, um inventário geral dos *taxa* deve ser compilado através de rastreios visuais com diversas ampliações. Com este procedimento é obtida uma panorâmica da composição da comunidade fitoplanctónica, factor que pode determinar a estratégia de quantificação a adoptar. A lista de *taxa* é posteriormente aperfeiçoada e concluída no decorrer do processo de quantificação.

A identificação deve ser realizada preferencialmente nas amostras *in vivo*, pois facilita a identificação de algumas espécies em que a utilização de fixadores mascara as características de diagnóstico de identificação.

Os organismos devem ser identificados até ao nível taxonómico previamente estabelecido com o apoio de Floras, fotografias, guias e chaves de identificação relevantes para a área geográfica em estudo. Para garantir uma correcta identificação, deve ser prestada especial atenção à descrição das espécies, características ecológicas (distribuição, habitat, etc.) e às ilustrações. Nesta fase, é recomendável compilar uma colecção de referência com fotografias, desenhos e descrições das espécies observadas. Os *taxa* encontrados que suscitem dúvidas de identificação ou cuja ocorrência não seja comum na região/massa de água, devem ser enviados a especialistas. Associada ao protocolo de amostragem e análise de fitoplâncton encontra-se uma tabela europeia harmonizada com os *taxa* descritos, códigos de identificação e as respectivas sinonímias.

É preferível uma correcta identificação a um nível taxonómico baixo do que uma identificação duvidosa a um nível taxonómico mais alto.



### 5.3.2. CONTAGEM

Na enumeração de algas e cianobactérias entende-se por unidades de contagem células, colónias ou filamentos independentes. Numa amostra, o mesmo *taxon* pode estar presente sob a forma de diferentes unidades de contagem que podem ser enumerados com diferentes ampliações (e.g. as colónias de *Microcystis* podem ser contadas em toda a câmara ou transeptos, enquanto que as células oriundas das colónias desagregadas podem ser contadas em quadrículas). O tipo de unidade de contagem deve ser registado na ficha de laboratório.

A estratégia e área de contagem a considerar depende especialmente da composição e densidade dos organismos fitoplanctónicos na amostra. Neste protocolo são enumeradas três estratégias de quantificação: contagem de toda a câmara, contagem por transeptos e contagem por quadrículas seleccionadas aleatoriamente. A contagem pode ser efectuada da seguinte forma:

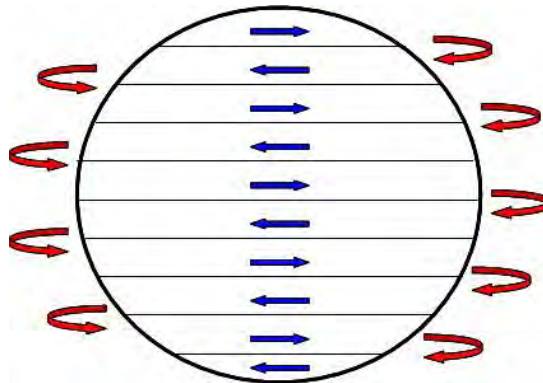
- com reduzida ampliação (e.g.  $\times 40$  ou  $\times 100$ ), toda a câmara é contada para os *taxa* de maiores dimensões, seguida de;
- contagem por transeptos com a ampliação intermédia (e.g.  $\times 250$ ), que auxilia na contagem de *taxa* com dimensão intermédia, que são demasiado pequenos para contagens com reduzida ampliação mas demasiado grandes para serem eficazmente contados utilizando elevada ampliação, seguida de;
- contagem por quadrículas seleccionadas aleatoriamente com elevada ampliação ( $\times 400$  ou mais), permitindo contar os *taxa* de reduzida dimensão.

#### **Contagem completa da câmara**

A estratégia da contagem completa da câmara é apropriada para amostras com reduzida densidade de algas e cianobactérias, para *taxa* de grandes dimensões (e.g. *Ceratium*), *taxa* pouco representados ou formas coloniais e filamentosas de grandes dimensões (e.g. *Microcystis*, *Fragilaria*). Esta estratégia pode ser aplicada utilizando uma ocular com micrómetro calibrado e uma ocular de traços móveis, que apresenta uma grelha composta por duas linhas horizontais paralelas que formam um transepto e uma terceira linha vertical ao centro.

A contagem completa da câmara pode efectuar-se deslocando a câmara no sentido esquerda-direita ou vice-versa (Figura 12), à medida que se contabilizam os indivíduos contidos no transepto, ou seja, entre as 2 linhas horizontais que passam a linha vertical. As algas e cianobactérias que cruzam a linha superior serão

contabilizadas, enquanto que as algas e cianobactérias que cruzam a linha inferior apenas serão contadas no próximo transepto.



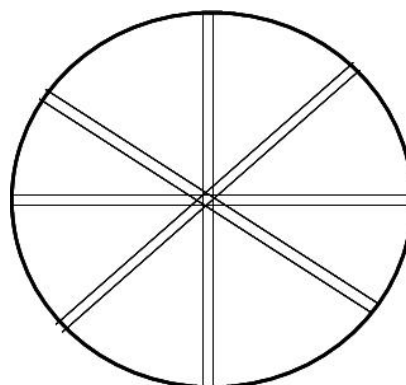
**Figura 12 - Exemplo de procedimento a adoptar para a contagem completa da câmara.**

Nas amostras com elevada densidade de formas coloniais de cianobactérias, esféricas ou filamentosas, aconselha-se a contagem de metade da câmara extrapolando-se o valor obtido para toda a área, de forma a diminuir o erro.

O número de organismos de cada *taxon*, a área da câmara, o volume de amostra sedimentado e, se aplicável, o factor de diluição/concentração serão as informações utilizadas para obter o número de algas e cianobactérias por volume de amostra.

### **Contagem por transeptos**

A estratégia da contagem por transeptos pode ser aplicada utilizando uma ocular com micrómetro calibrado e uma ocular de traços móveis e consiste em contar o número de organismos contidos em transeptos de área conhecida e limitada pelas duas linhas horizontais. No total é efectuado o número de transeptos adequados à amostra em questão, podendo-se utilizar de 2 a 5 transeptos, rodando a câmara e seleccionando o posicionamento de cada transepto aleatoriamente (Figura 13).



**Figura 13 - Exemplos de transeptos seleccionados para a contagem do número de organismos fitoplanctónicos.**

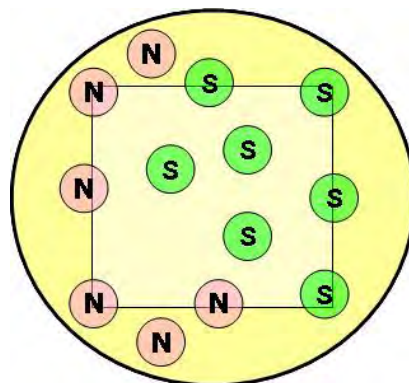
O número de organismos de cada *taxon* contabilizados na área abrangida pelos transeptos deve ser extrapolado para a área total da câmara. Após este passo, o número de organismos de cada *taxon*, a área da câmara, o volume de amostra sedimentado e, se aplicável, o factor de diluição/concentração podem ser utilizados para obter a densidade de algas e cianobactérias por volume de amostra.

### **Contagem por quadrículas**

A estratégia de contagem por quadrículas seleccionadas aleatoriamente pode ser aplicada utilizando uma ocular com micrómetro calibrado e uma ocular com retículo (quadrícula). Esta estratégia deve ser utilizada com elevada ampliação ( $\times 400$  ou mais) e em amostras ou para *taxa* com elevada densidade e/ou reduzida dimensão (dimensão inferior a  $50 \mu\text{m}$ ) (e.g. *Rhodomonas*).

Um dos processos consiste na contagem das algas e cianobactérias contidas em pelo menos 100 quadrículas seleccionadas aleatoriamente. Uma técnica para normalizar a contagem consiste em identificar e contar as algas e cianobactérias contidas nas quadrículas seleccionadas aleatoriamente até completar um total de 500 unidades, contando pelo menos 100 quadrículas. Uma outra opção é contar as algas e cianobactérias até as observações das espécies mais comuns atingirem um determinado valor (ex.: 100, 200 ou 300), que dependerá do nível de precisão ou limite de detecção requerido.

Na estratégia de contagem por quadrículas devem ser utilizados critérios consistentes de decisão quanto à enumeração de algas e cianobactérias que cruzam as linhas que delimitam essa mesma quadrícula. Um critério simples é esquematizado na Figura 14, em que apenas as algas e cianobactérias (células, colónias ou filamentos) contidas no interior da quadrícula ou que cruzem as linhas de cima e direita são contabilizadas.



**Figura 14 - Exemplo de um critério definido para a contagem de algas que cruzam a delimitação da quadrícula. A verde a algas contadas (S) e a vermelho as não contadas (N).**

O número médio de organismos de cada *taxon* por quadrícula, a área da quadrícula, a área da câmara, o volume de amostra sedimentado e, se aplicável, o factor de diluição/concentração podem ser utilizados para obter a densidade de algas e cianobactérias por volume de amostra.

### 5.3.3. DENSIDADE FITOPLANCTÓNICA

O número de algas e cianobactérias contabilizado por *taxa* é convertido em concentração por unidade de volume da amostra, segundo a equação:

$$N = X \times \frac{A \times d}{a \times v}$$

<b>N</b>	Número de unidades por volume na amostra (unidades/ml)
<b>X</b>	Número médio de unidades por quadrícula ou transepto (ou número total de unidades na câmara)
<b>A</b>	Área da câmara
<b>v</b>	Volume da amostra sedimentado na câmara
<b>a</b>	Área do campo de contagem (quadrícula, transepto ou câmara)
<b>d</b>	Factor de diluição ou de concentração da amostra (1 × diluído $d = 2$ ; 1 × concentrado $d = 0,5$ ), se aplicável

Em geral, a densidade fitoplanctónica é expressa em células por mililitro (cél/ml). Para exprimir a contagem de colónias e filamentos em cel/ml de amostra, deve ser estimado o número médio de células por colónia/filamento e multiplicado esse valor pelo número de colónias/filamentos. As seguintes situações devem ser tidas em consideração:

Para alguns *taxa* o número de células por colónia pode ser consistente (e.g. *Scenedesmus* com 2, 4 ou 8 células) enquanto que para outros não (e.g. *Microcystis*), podendo o número de células por colónia variar de algumas a milhões de células.

Para calcular o número de células no caso das **colónias filamentosas** (e.g. *Anabaena*), pode-se estimar o número médio de células por filamento, dividindo o comprimento médio de 10 filamentos pelo comprimento médio de 10 células. O número de células é estimado multiplicando o número médio de células por filamento pelo número de filamentos contados, de acordo com os procedimentos definidos para cada estratégia de contagem.

Para calcular o número de células em **colónias que formam filamentos em espiral** (e.g. *Anabaena circinalis*) pode-se estimar o número médio de células por filamento, multiplicando o número médio de células por volta pelo número médio

de voltas, em 10 filamentos. O número de células é estimado multiplicando o número médio de células por filamento pelo número de filamentos contados, de acordo com os procedimentos definidos para cada estratégia de contagem.

Para calcular o número de células em **colónias esféricas** ou **aproximadamente esféricas** (e.g. *Microcystis*) pode-se estimar o número médio de células por colónia, dividindo o volume médio de 10 colónias pelo volume médio de 10 células. Esta etapa é realizada através da medição dos diâmetros máximo e mínimo de cada colónia e célula, calculando o volume médio das colónias e das células como se de uma esfera se tratasse e em que o diâmetro corresponde à média dos diâmetros medidos. O número de células é estimado multiplicando o número médio de células por colónia pelo número de colónias contadas, de acordo com os procedimentos definidos para cada estratégia de contagem.

No caso das colónias em que a distinção das células é por vezes difícil (ex: *Oscillatoria*), o número médio de células poderá ser estimado dividindo o comprimento médio de 10 colónias pelo valor de comprimento médio das células referido na bibliografia. O número de células é estimado multiplicando o número médio de células por filamento pelo número de colónias contadas, de acordo com os procedimentos definidos para cada estratégia de contagem.

#### **5.4. CÁLCULO DO BIOVOLUME**

A elevada diversidade de formas e dimensões dos organismos que constituem o fitoplâncton faz com que algumas espécies possam dominar a biomassa com um número reduzido de algas e cianobactérias. De facto, a densidade fitoplanctónica não representa o contributo de cada *taxon* para a biomassa presente numa amostra. O volume celular das algas e cianobactérias, designado por biovolume fitoplanctónico ( $\text{mm}^3/\text{l}$ ), permite uma adequada e precisa comparação entre amostras e a quantificação do contributo dos diferentes grupos de fitoplâncton para a produção primária de um sistema léntico. O biovolume total de uma amostra corresponde ao somatório dos biovolumes determinados para os diferentes *taxa* presentes na amostra.

Para a determinação do biovolume, as células, colónias ou filamentos são medidos (e.g. largura, comprimento, diâmetro) com o auxílio de um micrómetro ou um programa de análise de imagem, e os seus volumes médios são estimados com base nas fórmulas geométricas que melhor se ajustam a cada organismo. Na bibliografia existem várias referências com valores de biovolume dos diferentes *taxa* e as formas geométricas associadas a cada espécie. Contudo, a transcrição

desses valores para os lagos e albufeiras localizadas em Portugal deverá ser efectuado com reserva devido à especificidade das regiões mediterrânicas.

O método de cálculo do biovolume, designado por método de Rott (1981), é composto pelos seguintes passos:

1. Associar a cada *taxon* identificado a figura geométrica adequada;
2. Com a correcta ampliação medir as dimensões lineares de 10 ou mais indivíduos de cada *taxon*<sup>13</sup>;
3. Calcular o volume de cada indivíduo recorrendo à fórmula da figura geométrica;
4. Determinar o volume médio para cada *taxon*;
5. Multiplicar o volume médio pela densidade de células/unidades obtida na quantificação:

$$\text{Biovolume}_{\text{taxon}} [\text{mm}^3/\text{l}] = \text{número de células/unidades} [\text{n}/\text{l}] \times \text{volume celular/unidade} [\mu\text{m}^3] \times 10^{-9}$$

Para as formas coloniais, o número médio de células deve ser estimado e multiplicado pelo volume médio de 10 células. Nas formas filamentosas em que é difícil distinguir entre células, o biovolume médio do filamento pode ser estimado recorrendo ao comprimento médio de 30 filamentos, à largura média de 5 filamentos e associando a forma do filamento a uma figura geométrica. Para as algas e cianobactérias em que não é possível medir as dimensões necessárias para o cálculo do volume celular, devem ser utilizados valores referidos na bibliografia.

A conversão de biovolume ( $\text{mm}^3/\text{l}$ ) em biomassa (peso húmido) ( $\text{mg}/\text{l}$ ) é efectuada na proporção de 1 para 1, ou seja,  $5 \text{ mm}^3/\text{l}$  corresponde a  $5 \text{ mg}/\text{l}$ .

No âmbito de programas de monitorização de rotina, e com o objectivo de reduzir a morosidade das análises microscópicas de fitoplâncton, diversos países utilizam os valores médios de biovolume por *taxon* calculados a partir de séries longas de dados. Este tipo de instrumento facilita o cálculo do biovolume, apesar de alguns *taxa* que apresentam maior variabilidade obrigarem à determinação do seu biovolume em cada amostra. Em Portugal prevê-se que os dados de monitorização, conjuntamente com a informação bibliográfica, sejam utilizados para produzir uma tabela normalizada de biovolumes fitoplanctónicos.

---

<sup>13</sup> O número de indivíduos medidos depende da variação de tamanho de cada *taxon* identificado na amostra. Para *taxa* com elevada variabilidade de dimensões o número de indivíduos medidos poderá aumentar até ao máximo de 50.

## **6. CONTROLO DE QUALIDADE**

A Directiva Quadro da Água exige que os métodos propostos para a avaliação do estado ecológico estejam de acordo com as normas (ISO, CEN, ou de organismos nacionais de normalização), que as equipas e laboratórios que produzam resultados analíticos disponham de programas controlo e garantia de qualidade (QA/QC) (NP EN ISO/IEC 17025:2005) e que participem regularmente em exercícios de intercalibração (*Proficiency testing programmes*).

Neste sentido, o presente documento teve como base as normas NP EN 25667-2:1996, EN 14996:2006, EN 15204:2006, NP EN ISO/IEC 17025:2005 e ISO 10260:1992.

### **6.1. CONTROLO DE QUALIDADE NA AMOSTRAGEM**

As campanhas de amostragem devem ser programadas em função das características morfométricas de cada albufeira, incluindo sempre a inspecção e manutenção do equipamento de campo e a calibração das sondas.

A equipa de amostragem deve ser constituída por operadores com formação e experiência em colheita de amostras. Os técnicos de amostragem devem frequentar, regularmente, cursos de formação e reciclagem dos conhecimentos e procedimentos de amostragem.

Durante as amostragens, de forma a garantir a qualidade da recolha das amostras, a sua integridade e a obtenção de informação pertinente deve ter-se em conta as seguintes recomendações:

- Preencher os campos da Ficha de Campo, tentando sempre que possível completá-la na sua totalidade;
- Documentar fotograficamente os aspectos relevantes encontrados;
- Movimentar a água em torno da área de amostragem o menos possível;
- Lavar previamente as garrafas e frascos de armazenamento e recolha com água da albufeira;
- Seguir rigorosamente os procedimentos de amostragem definidos;
- Assegurar uma correcta identificação dos frascos e garrafas;
- Acondicionar cuidadosamente as amostras antes de efectuar o seu transporte.

A ficha de campo tem uma secção de controlo de qualidade que tem de ser preenchida no campo, no final de cada sessão de amostragem.

De acordo com a frequência definida pelo Laboratório e com o Controlo de Qualidade da amostragem, dentro dos limites estabelecidos pelo Laboratório, deverão ser efectuadas colheitas em paralelo e/ou duplicados de colheita.

## 6.2. CONTROLO DE QUALIDADE NO LABORATÓRIO

O equipamento laboratorial deve ser inspeccionado e calibrado periodicamente. As soluções utilizadas devem ser substituídas a intervalos regulares e de acordo com as suas características químicas.

A determinação da **concentração de clorofila *a*** e a **preparação de amostras para a quantificação** pode ser efectuada por técnicos analistas, sem preparação específica para a identificação. Contudo, para assegurar a credibilidade dos resultados os técnicos devem frequentar, regularmente, cursos de formação e reciclagem dos conhecimentos e procedimentos laboratoriais.

No laboratório deve ter-se em conta as seguintes recomendações:

- Preencher todos os campos obrigatórios da Ficha de Laboratório, tentando sempre que possível completá-la na sua totalidade;
- Seguir rigorosamente os procedimentos de laboratório definidos;
- Periodicamente, para a análise de pigmentos, realizar ensaios internos de calibração para os replicados e/ou técnicos;
- Identificar e quantificar as fontes de erro e determinar o nível de confiança e precisão obtido no laboratório;
- Periodicamente, para a determinação da concentração de clorofila *a*, participar em ensaios de intercalibração entre laboratórios.

O trabalho de **identificação, contagem de fitoplâncton e cálculo do biovolume** fitoplanctónico apenas pode ser efectuada por técnicos especializados e experientes. É nesta fase do processo que as incertezas são maiores e, conseqüentemente, a probabilidade de ocorrerem erros é superior. De modo a gerir e minimizar os erros será necessário no futuro elaborar documentos de identificação e ecologia das espécies de algas e cianobactérias que ocorrem em Portugal, criar colecções de referência e organizar cursos de identificação e taxonomia. No laboratório, as seguintes recomendações deverão ser seguidas:



- Preencher todos os campos obrigatórios da Ficha de Laboratório, tentando sempre que possível completá-la na sua totalidade;
- Seguir rigorosamente os procedimentos definidos;
- Entre 10 e 15% das amostras deverão ser analisadas também por outro técnico, de modo a garantir a precisão das identificações e quantificações;
- Periodicamente, deverão ser efectuadas contagens em replicados e entre técnicos. As quantificações de replicados e entre técnicos deverão variar dentro de um intervalo de  $\pm 20\%$  da primeira contagem.
- Identificar e quantificar as fontes de erro e determinar o nível de confiança e precisão obtido no laboratório;
- Participar periodicamente em ensaios de intercalibração inter-laboratórios.

Os resultados analíticos devem ser organizados de forma a permitir o cálculo de critérios de precisão de duplicados e de incertezas de amostragem e de laboratório, tanto no global do Laboratório (área da amostragem e área técnica de biologia), como por técnico de amostragem e técnico de Laboratório.

De modo a controlar a qualidade da limpeza das câmaras de sedimentação aconselha-se a realização de um branco com água desmineralizada e solução de Lugol, sempre que sejam efectuadas novas análises. Esse mesmo branco deverá ser processado como uma amostra de modo a despistar eventuais contaminações no material/equipamento utilizado.

A ficha de laboratório tem uma secção de controlo de qualidade que deve ser preenchida na totalidade.

### **6.3. CONTROLO DE QUALIDADE DOS DADOS**

Os dados obtidos a partir de uma amostra e ao longo das diferentes fases do presente protocolo, devem ser manuseados cuidadosamente e compilados num único ficheiro ou integrados numa base de dados. Este procedimento evita a perda de informação relevante e permite comparar a informação de campo (Ficha de Campo) com os resultados obtidos no laboratório (Ficha de Laboratório).

Neste sentido, deve ter-se em conta as seguintes recomendações:

- As designações utilizadas na Ficha de Campo e na Ficha de Laboratório devem ser coincidentes para que, em caso de dúvida, possam vir a ser confrontadas (ex: aspectos de ecologia das espécies);

- Arquivar toda a documentação de campo e laboratório (amostras, fichas, fotografias) por um período nunca inferior a 5-6 anos;
- Organizar os dados em formato electrónico, numa base de dados que integre a informação de campo e laboratório. Os inventários (espécies, contagens e biovolumes) devem ser introduzidos e posteriormente validados, de modo a eliminar erros na introdução dos dados.

## 7. GLOSSÁRIO

- **Associações de algas e cianobactérias** – comunidades fitoplanctónicas que tendem a repetir-se em determinadas condições ambientais, épocas do ano ou tipos de massa de água.
- **Algas perifíticas** – organismos autotróficos unicelulares que vivem associados a qualquer substrato de fundo dos ecossistemas aquáticos.
- **Biovolume** – Expressão do volume ocupado pela biomassa algal e de cianobactérias.
- **Bom estado das águas de superfície** – estado em que se encontra uma massa de águas de superfície quando os seus estados ecológico e químico são considerados, pelo menos, “bons”
- **Bom estado ecológico** – estado alcançado por uma massa de águas de superfície quando os valores dos elementos que caracterizam a qualidade ecológica apenas se desviam ligeiramente dos que ocorrem em condições de referência.
- **Bom estado químico** – estado químico alcançado por uma massa de águas de superfície em que as concentrações de poluentes designados por substâncias prioritárias não ultrapassam as normas de qualidade ambiental definidas.
- **Bom potencial ecológico** – estado alcançado por uma massa de água fortemente modificada após os valores dos elementos que caracterizam a qualidade ecológica apenas se desviam ligeiramente dos que ocorreriam caso a massa de água atingisse o máximo potencial ecológico.
- **Campo de visão** – campo óptico do microscópio.
- **Cianobactérias** - são organismos fitoplanctónicos unicelulares, filamentosos ou coloniais. Têm uma estrutura celular procariótica (bactérias) e realizam a fotossíntese pois possuem pigmentos fotossintéticos (e.g. clorofila). Algumas espécies de cianobactérias formam florescências fitoplanctónicas e produzem cianotoxinas.
- **Cianotoxinas** - toxinas produzidas por algumas espécies de cianobactérias. Encontram-se dentro das cianobactérias (toxinas intracelulares) ou em solução na água quando as células das cianobactérias se degradam (toxinas extracelulares). Podem ser neurotoxinas, hepatotoxinas ou dermatotoxinas. As toxinas podem afectar a saúde dos animais e pessoas directamente por

contacto ou ingestão de água ou indirectamente ao longo da cadeia alimentar.

- **Clorofilas** – grupo de pigmentos fotossintéticos.
- **Condições de referência** – estado ecológico, no presente ou no passado, em que os valores dos elementos físico-químicas, hidromorfológicos e biológicas correspondem aos valores na ausência de pressões antropogénicas significativas.
- **Disco de Secchi** – instrumento usado para medir a transparência da água. Geralmente tem 20 cm de diâmetro e apresenta quadrantes pretos e brancos alternados. Preso por um fio é mergulhado na água até deixar de ser visto pelo observador. A profundidade a que deixa de ser visto é uma medida da transparência da água designada por profundidade de Secchi.
- **Epilímnio** – estrato superior da coluna de água, num lago ou albufeira termicamente estratificado. Esta camada é constituída por água mais quente.
- **Espectrofotometria** – método de análise óptico baseado na medida das densidades ópticas de uma substância para diferentes comprimentos de onda.
- **Estado das águas superficiais** - expressão global do estado em que se encontra uma determinada massa de águas superficiais, definido em função do pior dos dois estados, ecológico ou químico, dessas águas.
- **Estado ecológico** - expressão da qualidade estrutural e funcional dos ecossistemas aquáticos associados às águas superficiais, classificada nos termos de legislação específicas considerando os elementos que caracterizam a qualidade ecológica.
- **Eutrofização** – crescimento acelerado de algas, cianobactérias e formas superiores de plantas aquáticas como resultado do enriquecimento do meio aquático com nutrientes, sobretudo compostos de azoto e/ou fósforo, perturbando o equilíbrio biológico e a qualidade das águas em causa.
- **Garrafa Hidrográfica** – instrumento, geralmente cilíndrico, utilizado para recolher amostras de água a profundidades definidas pelo operador.
- **GPS** – acrónimo do inglês *Global Position System*; sistema de posicionamento por satélite que permite a determinação da posição de um receptor na superfície da Terra.

- **Hipolímnio** - estrato inferior da coluna de água, num lago ou albufeira termicamente estratificado. Esta camada é constituída por água mais quente.
- **Limite de detecção** – a menor quantidade de entidades/concentração numa amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente com exactidão.
- **Limite de quantificação** - a menor quantidade de entidades/concentração numa amostra que pode ser detectada com exactidão (análogo ao Limite de detecção)
- **Massas de água fortemente modificada** – massa de água que, em resultado de alterações físicas derivadas da actividade humana, adquiriu um carácter substancialmente diferente.
- **Massa de água superficial** – massa de água distinta e significativa de águas de superfície, como por exemplo um lago, uma albufeira, um ribeiro, rio ou canal, um troço de ribeiro, rio ou canal, águas de transição ou uma faixa de águas costeiras.
- **Monitorização** - processo de recolha e processamento de informação sobre as várias componentes do ciclo hidrológico e elementos de qualidade para a classificação do estado das águas, de forma sistemática, visando acompanhar o comportamento do sistema ou um objectivo específico.
- **Taxon** – categoria taxonómica (e.g. família, género, espécie). Singular de *taxa*
- **Termoclina** – estrato da coluna de água em que a temperatura varia rapidamente com o aumento da profundidade num lago ou albufeira termicamente estratificado (sinónimo de metalímnio).
- **Turbidez abiogénica** – redução da transparência da água devido a compostos inorgânicos (e.g. siltes, argilas).
- **Zona eufótica (zona fótica)** – parte da coluna de água exposta a luz solar suficiente para que ocorra fotossíntese.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- APHA, American Public Health Association (1999). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 10300 Periphyton*. Washington, 20th Edition.
- Barbe J., Lavergne E., Rofes G., Lascombe M., Rivas Bornard, CH., J. De Benedittis (1990). *Diagnose rapide des plans d'eau*. Informations Techniques du CEMAGREF, **79**: 1-8.
- Brettum, P. (1989). *Alger som indikatorer pa vannkvalitet I norske innsjoer. Planteplankton*. NIVA Report, 111pp.
- Brettum, P. & Andersen, T. (2005). *The use of phytoplankton as indicators of water quality*. NIVA Report, 197pp.
- Carvalho, Laurence; Dudley, Bernard; Dodkins, Ian; Clarke, Ralph; Jones, John; Thackeray, Stephen; Maberly, Stephen. 2007 *Phytoplankton Classification Tool (Phase 2). Final report*. Edinburgh, SNIFFER (Scotland & Northern Ireland Forum for Environmental Research), 94pp. (CEH Project Number: C03236)
- Catalan J., Ventura M., Munné A., Godé L. (2003). Desenvolupament d'un índex integral de qualitat ecológica i regionalització ambiental dels sistemes lacustres de Catalunya. Agència Catalana del Agua, 177 pp.
- CEN/TC230/WG2/TG3 N108 *Water Quality – Phytoplankton biovolume determination by microscopic measurement of cell dimensions*
- CEN/TC230/WG2/TG3 N109 *Water Quality – Guidance on quantitative and qualitative sampling of phytoplankton from inland waters*
- Comissão Europeia. 2000 - Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um Quadro de Acção Comunitária no Domínio da Política da Água. Jornal Oficial das Comunidades Europeias de 22 Dezembro de 2000. L 327, p.1-72.
- Comissão Europeia. 2008 – Decisão da Comissão 2008/915/CE de 30 de Outubro de 2008 que estabelece, nos termos da Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, os valores da classificação dos sistemas de monitorização dos Estados-Membros no seguimento do exercício de intercalibração.
- EN 14996:2006. *Water quality - Guidance on assuring the quality of biological and ecological assessments in the aquatic environment*. Comité Européen de Normalisation (CEN/TC 230).

- EN 15204:2006. *Water Quality Standard for routine analysis of phytoplankton abundance and composition using inverted microscopy* (Utermöhl technique), 1-38 pp. Comité Européen de Normalisation (CEN/TC 230).
- EN ISO 5667-1:2006 *Water Quality – Sampling. Part 1: Guidance on the design of sampling programmes and sampling techniques*
- EN ISO 5667-3:2003 *Water Quality – Sampling. Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples*, Comité Européen de Normalisation (CEN/TC 230).
- EN ISO 10260:1992. *Water quality – Measurement of biochemical parameters – Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration*, Int. Org. Standard., Geneva, 1st edn, 6 pp.
- Hörnström, E. (1981). Trophic characterization of lakes by means of qualitative phytoplankton analysis. *Limnologica* (Berlin) **13**, 249-261.
- Hutchinson G.E. (1961). The paradox of the plankton. *American Naturalist* **95**, 137-145.
- Hutchinson G. E. (1967). *A treatise on Limnology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1115 pp.
- ISO 5667-4:1987 *Water Quality – Sampling. Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made*, Int. Org. Standard., Geneva
- ISO 5667-5:2006 *Water Quality – Sampling. Part 5: Guidance on sampling of drinking water from treatment works and piped distribution systems*, Int. Org. Standard., Geneva
- Jeffrey S.W., Humphrey G. (1975) New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pfl.* **167**: 191–194.
- Lorenzen C. J. (1967). Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.* **12** (2), 343–346.
- Lund J.W.G., Kipling C., Le Cren E.D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* **11**: 143-170.
- NP EN ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*, Instituto Português de Qualidade.
- OCDE (1982). *Eutrophication of Waters, Assessment and Control*. Organisation for Economic Cooperation and Development. Paris, 154 pp.

- Reynolds C.S. (1984). *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Reynolds C.S. (1990). Temporal scales of variability in pelagic environments and the response of phytoplankton. *Freshwater Biology* **23**: 25-53.
- Reynolds C., Huszar V., Kruk C., Naselli-Flores L, Melo S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* **24**: 417-428.
- Reynolds C. (2006). *Ecology of phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Rott E. (1981). Some results from phytoplankton counting intercalibrations. *Schweiz. Z. Hydrol.* 43: 34-62.
- Scheffer M., Rinaldi S., Huisman J., Weissing F.J. (2003). Why plankton communities have no equilibrium: solutions to the paradox. *Hydrobiologia* **491**: 9-18.
- Sládeček, V. (1973). System of water quality from the Biological point of view. *Arch. Hydrobiol.* **7**: 1-218.
- Tremel, B. (1996) "Determination of the trophic state by qualitative and quantitative phytoplankton analysis in two gravel pit lakes" *Hydrobiologia* 323: 1-38
- Utermöhl H. (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt int Ver theor angew Limnol* **9**: 1- 38.
- Vasconcelos, V.M., Araújo, F. (1994). Cianobactérias. Um risco para o ambiente e para a Saúde Humana. Ed. Direção Geral da Saúde e Instituto da Água. 24 p.
- Willén T. (1962). Studies on the phytoplankton of some lakes connected with or recently isolated from the Baltic. *Oikos* **13**: 169-199.



# **ANEXOS**




## **ANEXO I - FICHA DE CAMPO**



## FICHA DE CAMPO - FITOPLÂNCTON

<b>Lago/Albufeira</b>		Estação		Data		
		M (m)		Hora de Inicio		Fim
Código		P (m)		Técnico		

<b>Condições Meteorológicas</b> (assinalar com O)					Temperatura ar (°C)	
Sol	Pouco Nublado	Muito Nublado	Chuva	Vento (direcção) 	Cota (m)	
Sem vento	Vento fraco	Vento moderado	Vento forte		Cor e odor	

Condutividade (µS/cm)		pH		Descrição da Amostra
Profundidade de Secchi (m)		Zona eufótica (2,5 × Secchi) (m)		
Estratificação?		Epilímnio (m)		

Amostra Integrada Zona Eufótica			
<b>Fitoplâncton <i>in vivo</i></b>	volume (L)		código amostra
<b>Fitoplâncton (Fixado)</b>	volume (L)		código amostra
<b>Clorofila a</b>	volume (L)		código amostra
<b>Físico-químicos</b>	volume (L)		código amostra

Outras Amostras					
i.	profundidade		volume (L)		código amostra
ii.	profundidade		volume (L)		código amostra

**Observações:**

# FICHA DE CAMPO - FITOPLÂNCTON

<b>Lago/Albufeira</b>	Estação	Data	
		Técnico	

Prof.	Temp.	Oxig.													
z (m)	°C	mg/l	%												
0															
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17															
18															
19															
20															
22															
24															
26															
28															
30															
32															
34															
36															
38															
40															
45															
50															
55															
60															
65															
70															
75															
80															
85															
90															
95															
100															

**CONTROLO DE QUALIDADE**

- O cabeçalho foi totalmente preenchido?
- As condições meteorológicas foram registadas?
- Os parâmetros físico-químicos foram medidos e registados?
- Foi registado o tipo de amostra e os volumes armazenados?
- As amostras foram identificadas e armazenadas?

INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO DA FICHA DE CAMPO

Folha 1/2

<b>Lago/Albufeira</b>	Designação do lago ou da albufeira
<b>Código</b>	Código de identificação do lago ou albufeira
<b>Estação</b>	Designação ou código da estação de amostragem
<b>M (m)</b>	Coordenada cartesiana Hayford Gauss militar, distância ao meridiano em metros
<b>P (m)</b>	Coordenada cartesiana Hayford Gauss militar, distância ao paralelo em metros
<b>Data</b>	Data de amostragem (aaaa/mm/dd)
<b>Hora de Início</b>	Hora de início da amostragem
<b>Hora de Fim</b>	Hora de fim da amostragem
<b>Técnico</b>	Identificação do técnico responsável
<b>Condições Meteorológicas</b>	Assinalar com círculo as condições de nebulosidade, de vento e com uma seta a direcção do vento
<b>Temperatura ar (°C)</b>	Valor de temperatura do ar, em graus Celsius
<b>Cota (m)</b>	Cota a que se encontra o nível da água, em metros
<b>Cor e odor</b>	Apreciação qualitativa da cor (e.g. verde, acastanhada, incolor) e cheiro (e.g. inodoro, matéria orgânica, terra)
<b>Condutividade (µS/cm)</b>	Registar a condutividade eléctrica da água sub-superficial, em micro Siemens por centímetro
<b>pH</b>	Registar o pH da água sub-superficial
<b>Profundidade de Secchi (m)</b>	Registar a profundidade, em metros, a que aparece e desaparece o disco de Secchi
<b>Zona eufótica (2,5 × Secchi) (m)</b>	Registar a profundidade máxima da zona eufótica, em metros, estimado como 2,5 vezes a profundidade de Secchi
<b>Estratificação?</b>	Assinalar <b>Sim</b> caso se registre uma estratificação térmica ou <b>Não</b> caso a albufeira/lago se apresente em circulação
<b>Epilímnio (m)</b>	Registar, em metros e em caso de estratificação térmica, a profundidade máxima do Epilímnio
<b>Tipo de Amostra</b>	Descrever o tipo de amostra colhida: composta de um <b>determinado número</b> de sub-amostras ou metros da coluna de água
<b>Fitoplâncton <i>in vivo</i></b>	Registar volume (L) e código da amostra
<b>Fitoplâncton (Fixado)</b>	Registar volume (L) e código da amostra fixada e reservada para a quantificação, identificação e determinação do biovolume fitoplanctónico
<b>Clorofila <i>a</i></b>	Registar volume (L) e código da amostra reservada para a análise da concentração da clorofila <i>a</i> e restantes pigmentos fotossintéticos
<b>Físico-químicos</b>	Registar volume (L) e código da amostra reservada para a determinação de parâmetros físico-químicos (e.g. nutrientes)
<b>Outras Amostras</b>	Registar a designação, profundidade de colheita (m), volume (L) e código de outras amostras colhidas (e.g. físico-químicos)
<b>Observações</b>	Registar os aspectos importantes e/ou fotografias

**Lago/Albufeira** Designação do lago ou da albufeira  
**Estação** Designação ou código da estação de amostragem  
**Data** Data de amostragem (aaaa/mm/dd)  
**Técnico** Identificação do técnico responsável

**Quadro para o registo dos perfis de temperatura, oxigénio dissolvido, saturação de oxigénio e parâmetros suplementares, no lado direito. Espaço para esboçar e analisar os perfis, no lado esquerdo.**

**Controlo de Qualidade** Assinalar as caixas em caso afirmativo



## **ANEXO II - FICHA DE LABORATÓRIO**



## PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

<b>Lago/Albufeira</b>	Estação		Tipo de Amostra
	Data Amostragem		
Código	Código Amostra		

Data Filtração	Data Determinação	Técnico
----------------	-------------------	---------

Filtro 1	
Volume Filtrado (L)	

Filtro 2	
Volume Filtrado (L)	

Filtro 3	
Volume Filtrado (L)	

Comprimento de onda	Absorvância
630 nm	
647 nm	
664 nm	
665 nm	
750 nm	
665 nm, após acidificação	
750 nm, após acidificação	

Comprimento de onda	Absorvância
630 nm	
647 nm	
664 nm	
665 nm	
750 nm	
665 nm, após acidificação	
750 nm, após acidificação	

Comprimento de onda	Absorvância
630 nm	
647 nm	
664 nm	
665 nm	
750 nm	
665 nm, após acidificação	
750 nm, após acidificação	

### Equação Monocromática de Lorenzen (1967)

	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3	Média
Clorofila a (mg/m <sup>3</sup> )				
Feopigmentos (mg/m <sup>3</sup> )				

### Equação Tricromática de Jeffrey & Humphrey (1975)

	Filtro 1	Filtro 2	Filtro 3	Média
Clorofila a (mg/m <sup>3</sup> )				
Clorofila b (mg/m <sup>3</sup> )				
Clorofila c (mg/m <sup>3</sup> )				

## FÍSICO-QUÍMICOS E HIDROMORFOLÓGICOS DE SUPORTE

Código Amostra		Tipo de Amostra	
----------------	--	-----------------	--

Profundidade de Secchi (m)		Azoto Total (mg N/L)		Ortofosfato (mg P/L)	
Cor (mg/L - escala Pt-Co)		Nitritos (mg NO <sub>2</sub> /L)		CQO <sub>5d</sub> (mg/L)	
Sólidos Suspensos Totais (mg/L)		Nitratos (mg NO <sub>3</sub> /L)		CBO (mg/L)	
Dureza (mg CaCO <sub>3</sub> /L)		Amónia (mg NH <sub>4</sub> /L)		pH	
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> /L)		Fósforo Total (mg P/L)		Condutividade (µS/cm)	
Cota (m)		Estratificação Térmica?		Tempo de Residência (anos)	

**Observações:**

<b>CONTROLO DE QUALIDADE</b>	O cabeçalho foi totalmente preenchido? <input type="checkbox"/> As absorvâncias e valores de concentração de pigmentos foram registados? <input type="checkbox"/> Os elementos físico-químicos e hidromorfológicos foram registados? <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
------------------------------	---	--

# COMPOSIÇÃO E QUANTIFICAÇÃO FITOPLANCTÓNICA

<b>Lago/Albufeira</b>	Estação		Tipo de Amostra
	Data Amostragem		
Código		Código Amostra	

Data Sedimentação		Data Análise		Técnico	
-------------------	--	--------------	--	---------	--

Câmara Utermöhl					Estratégia de contagem				
	5 ml	10 ml	25 ml	50 ml	100 ml				
Factor Diluição		Factor Concentração		Tempo Sedimentação (horas)		Completa	Transeptos	Quadrículas Aleatórias	Número Transeptos/Quadrículas

	Taxon	Grupo Fitoplanctónico	Número Células	Densidade (cél/ml)	Biovolume do Taxon ( $\mu\text{m}^3$ )	Biovolume ( $\text{mm}^3/\text{L}$ )
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
<b>Total</b>						

**Observações:**

<b>CONTROLO DE QUALIDADE</b>	O cabeçalho foi totalmente preenchido? <input type="checkbox"/> O tipo de estratégia de contagem e as quantificações foram registados? <input type="checkbox"/>	
------------------------------	--	--

**Pigmentos Fotossintéticos**

<b>Lago/Albufeira</b>	Designação do lago ou da albufeira
<b>Código</b>	Código de identificação do lago ou albufeira
<b>Estação</b>	Designação ou código da estação de amostragem
<b>Data Amostragem</b>	Data de amostragem (aaaa/mm/dd)
<b>Código Amostra</b>	Código da amostra utilizada para determinar a concentração de pigmentos fotossintéticos
<b>Tipo de Amostra</b>	Registar qual o tipo de amostra colhida: composta da zona eufótica; composta do Epilimnio; composta de um <b>determinado número</b> de metros da coluna de água
<b>Data Filtração</b>	Data em que a filtração foi efectuada (aaaa/mm/dd)
<b>Data Determinação</b>	Data em que a determinação da concentração de pigmentos fotossintéticos foi efectuada (aaaa/mm/dd)
<b>Técnico</b>	Identificação do técnico responsável
<b>Filtro 1</b>	Registar o volume de amostra filtrado no filtro 1 e as respectivas leituras espectrofotométricas
<b>Filtro 2</b>	Registar o volume de amostra filtrado no filtro 2 e as respectivas leituras espectrofotométricas
<b>Filtro 3</b>	Registar o volume de amostra filtrado no filtro 3 e as respectivas leituras espectrofotométricas
<b>Equação Monocromática</b>	Registar para cada filtro as concentrações de Clorofila <i>a</i> e Feopigmentos, determinadas segundo a equação monocromática de Lorenzen. Indicar a média aritmética de cada pigmento.
<b>Equação Tricromática</b>	Registar para cada filtro as concentrações de Clorofila <i>a</i> , Clorofila <i>b</i> e Clorofila <i>c</i> , determinadas segundo a equação tricromática de Jeffrey & Humphrey. Indicar a média aritmética de cada elemento.

**Físico-químicos e hidromorfológicos de suporte**

<b>Código Amostra</b>	Código da amostra utilizada para determinar a concentração de pigmentos fotossintéticos
<b>Tipo de Amostra</b>	Registar qual o tipo de amostra colhida: composta da zona eufótica; composta do Epilimnio; composta de um <b>determinado número</b> de metros da coluna de água
<b>Profundidade de Secchi (m)</b>	Registar a profundidade, em metros, a que aparece e desaparece o disco de Secchi
<b>Cor (mg/L – escala Pt-Co)</b>	Registar a cor, em miligramas por litro (escala pt-Co)
<b>Sólidos Suspensos Totais (mg/L)</b>	Registar a concentração de Sólidos Suspensos Totais, em miligramas por litro
<b>Dureza (mg CaCO<sub>3</sub>/L)</b>	Registar a dureza, em miligramas de carbonato de cálcio por litro

<b>Alcalinidade (mg CaCO<sub>3</sub>/L)</b>	Registar a alcalinidade, em miligramas de carbonato de cálcio por litro
<b>Azoto Total (mg N/L)</b>	Registar a concentração de azoto total, em miligramas de azoto por litro
<b>Nitritos (mg NO<sub>2</sub>/L)</b>	Registar a concentração de nitritos, em miligramas de nitrito por litro
<b>Nitratos (mg NO<sub>3</sub>/L)</b>	Registar a concentração de nitratos, em miligramas de nitrato por litro
<b>Amónia (mg NH<sub>4</sub>/L)</b>	Registar a concentração de amónia, em miligramas de amónia por litro
<b>Fósforo Total (mg P/L)</b>	Registar a concentração de fósforo total, em miligramas de fósforo por litro
<b>Ortofósforo (mg P/L)</b>	Registar a concentração de ortofósforo, em miligramas de fósforo por litro
<b>CQO<sub>5d</sub> (mg/L)</b>	Registar o valor de Carência Química de Oxigénio, em miligramas por litro
<b>CBO (mg/L)</b>	Registar o valor de Carência Bioquímica de Oxigénio, em miligramas por litro
<b>pH</b>	Registar o pH
<b>Condutividade (µS/cm)</b>	Registar a condutividade eléctrica, em micro Siemens por centímetro
<b>Cota (m)</b>	Cota a que se encontra o nível da água, em metros
<b>Estratificação Térmica?</b>	Assinalar <b>Sim</b> caso se registe uma estratificação térmica ou <b>Não</b> caso a albufeira/lago se apresente em circulação
<b>Observações</b>	Registar os aspectos importantes e/ou fotografias
<b>Controlo de Qualidade</b>	Assinalar as caixas em caso afirmativo

### Composição e quantificação fitoplanctónica

<b>Lago/Albufeira</b>	Designação do lago ou da albufeira
<b>Código</b>	Código de identificação do lago ou albufeira
<b>Estação</b>	Designação ou código da estação de amostragem
<b>Data Amostragem</b>	Data de amostragem (aaaa/mm/dd)
<b>Código Amostra</b>	Código da amostra utilizada para determinar a concentração de pigmentos fotossintéticos
<b>Tipo de Amostra</b>	Registar qual o tipo de amostra colhida: composta da zona eufótica; composta do Epilímnio; composta de um <b>determinado número</b> de metros da coluna de água
<b>Data Sedimentação</b>	Data em que a sedimentação foi efectuada (aaaa/mm/dd)
<b>Data Análise</b>	Data em que a análise quantitativa foi efectuada (aaaa/mm/dd)
<b>Técnico</b>	Identificação do técnico responsável
<b>Câmara Utermöhl</b>	Assinalar com círculo o volume da câmara de Utermöhl utilizada.
<b>Factor Diluição</b>	Se efectuada, assinalar o factor de diluição utilizado. Se a amostra for diluída uma vez o factor será 2, se for diluída duas vezes o factor será 4.
<b>Factor Concentração</b>	Se efectuada, assinalar o factor de concentração utilizado. Se a amostra for concentrada uma vez o factor será 0,5, se for concentrada duas vezes o factor será 0,25.
<b>Tempo Sedimentação (horas)</b>	Registar o tempo de sedimentação da amostra, em horas.
<b>Estratégia de contagem</b>	Assinalar com círculo a/s estratégia/s de contagem utilizada/s.
<b>Número Transeptos/Quadrículas</b>	Registar o número de transeptos e/ou quadrículas contados.
<b>Quadro para o registo dos <i>taxa</i> observados, o grupo fitoplanctónico a que pertencem, o número de células contadas, a densidade de células por mililitro, o biovolume da unidade de contagem e biovolume total do <i>taxon</i> na amostra do respectivo <i>taxon</i>.</b>	
<b>Observações</b>	Registar os aspectos importantes e/ou fotografias
<b>Controlo de Qualidade</b>	Assinalar as caixas em caso afirmativo





### ANEXO III - BIBLIOGRAFIA DE IDENTIFICAÇÃO

Recentes monografias das séries *Süßwasserflora von Mitteleuropa* estabelecidas por A Pascher e *Das Phytoplankton des Süßwassers*, estabelecida por G. Huber-Pestalozzi.

Taxonomia das Oscillatoriales actualizada segundo Anagnostidis & Komárek (1988) e Komarková-Legnerová & Cronberg (1992)

Identificação das Nostocolas actualizada com artigos específicos (e.g. Komarková-Legnerová & Eloranta 1992).

Anagnostidis, K. & J. Komárek, 1988. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 3-Oscillatoriales. *Arch. Hydrobiol., Algol. Stud.*, 50-53: 327-472.

Bourrelly, P. 1966. *Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. Tome I : Les algues vertes*. Édition N. Boubée & Cie, Paris, 511pp.

Bourrelly, P. 1968. *Les algues d'eau douce. Tome II : Les algues jaunes et brunes*. Édition N. Boubée & Cie, Paris, 440 pp.

Bourrelly, P. 1970. *Les Algues d'eau douce. Tome III. Les Algues Bleus et Rouges*. Édition N. Boubée & Cie, Paris, 512 pp.

Cleve-Euler, A., 1951. *Die Diatomeen von Schweden und Finland*. Almqvist & Wiksells, Bokryckeri, Stockholm, 1580 pp.

Krammer, K. & H. Lange-Bertalot. 1986. *Süßwasserflora von Mitteleuropa : Bacillariophyceae*. Gustave Fisher Verlag, Stuttgart. 876 p.

Komárek, J. & K. Anagnostidis. 1968. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2 – Chroococcales. *Algological Studies* 73: 157-226.

Komáreck, J. & K. Anagnostidis, 1989. Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3 Nostocales. *Arch Hydrobiol. Suppl.* 82: 247-345.

Geitler, L., 1932. Cyanophyceae. Leipzig. In *Rabenhorst's Kryptogamen-Flora* 14. Johnason reprint Corporation, N.Y., 1196 p.

Komáreck, J. & K., Anagnostidis, 1999. Cyanoprocaryota 1. Teil: Chroococcales. *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/1. Stuttgart : Fisher. 548 p.

Komarková-Legnerová, J. & G. Cronberg, 1992. New and recombined filamentous Cyanophytes from lakes in South Scania, Sweden. *Arch Hydrobiol., Algol. Stud.*, 67: 21-31.


Komarková-Legnerová, J. & P. Eloranta, 1992. Planktic blue-green algae (Cyanophyta) from Central Finland (Jyväskylä region) with special reference to the genus *Anabaena*. *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.*, 67: 103-133.

Hubber-Pestalozzi, G. 1941. die Binnengewässer. *Das Phytoplankton des Süsswassers* Band 16 Teil 1-7.

Růžička, J., 1977. *Die Desmidiaceen Mitteleuropas*. Band 1. Lieferung 1, 2, Editor E. Schweizerbart'sche, Stuttgart, Germany.

Van Heurck, H., 1963. *Traité des Diatomées*. J.R. Hansen, Bruxelles, 569p.

Whiford, L .A. & G. J. Schumacher, 1973. *A Manual of Fresh-water algae*. Sparks Press, Raleigh, N.C., 324 pp.



**Instituto da Água, I.P.  
Av. Almirante Gago Coutinho, 30  
1049-066 Lisboa**

**Tel: 21 843 00 00  
Fax: 21 847 35 71**

**e-mail: [inforag@inag.pt](mailto:inforag@inag.pt)  
[www.inag.pt](http://www.inag.pt)**