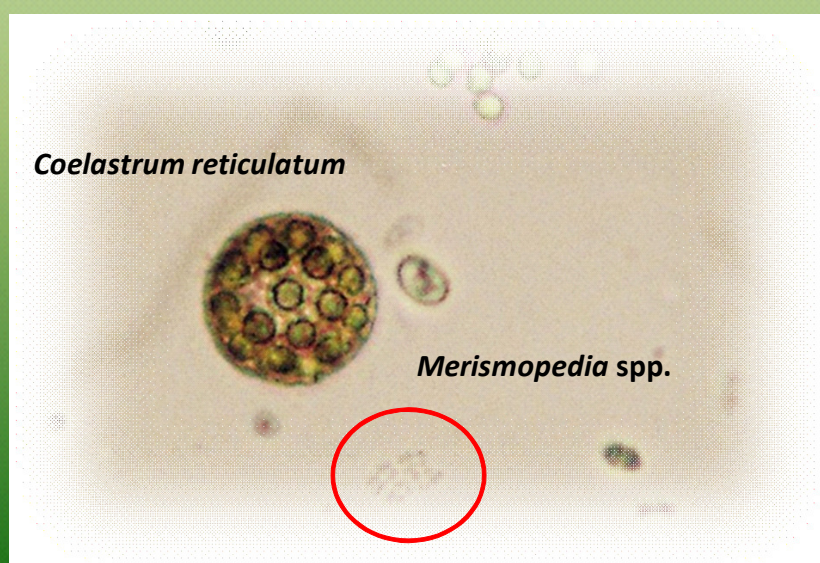


ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON

Exercício realizado na Agência Portuguesa do Ambiente, (APA) Laboratório de Referência do Ambiente, (LRA) em ABRIL/MAIO 2011



RELATÓRIO

JULHO 2011

LEONOR CABEÇADAS* e JOÃO FERREIRA**

* Agência Portuguesa do Ambiente, APA

** Instituto da Água, INAG

No âmbito de um Projecto de colaboração INAG, APA e CIIMAR

ÍNDICE

1 – ENQUADRAMENTO	1
2 – OBJECTIVOS	2
3 – PLANEAMENTO DO EXERCÍCIO DE ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON	3
3.1 – Fundamentos teóricos do método utilizado	3
3.2 – Critérios adoptados para controlo das fontes de variabilidade associadas	4
3.3 – Cálculo da concentração do fitoplâncton	5
3.4 – Síntese do procedimento adoptado	6
3.4.1 – Homogeneização e sedimentação da amostra	6
3.4.2 – Volume da amostra	6
3.4.3 – Área da câmara de sedimentação	6
3.4.4 – Microscópio de inversão	7
3.4.5 – Estratégia de contagem	7
3.4.6 – Factores de conversão	7
3.4.7 – Unidades taxonómicas seleccionadas	7

3.4.8 – Tempo de análise da amostra	8
-------------------------------------	---

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO 9

4.1 – Abundância de Fitoplâncton 10

4.1.1 – Abundância relativa das frações de Fitoplâncton Total 11

4.1.2 – *BoxPlots* 14

4.1.3 – Carta de Controle 14

4.1.4 – Relação Abundância vs Biovolume 15

4.2 – Esforço de Contagem vs Precisão 19

4.2.1 – Teste Mann-Whitney -Contagens de *Merismopedia* spp. 19

4.2.2 – Erros estatísticos associados à contagem 20

4.2.3 – Coeficiente de Variação 22

5 – CONCLUSÕES 24

6 – REFERÊNCIAS 27

ANEXO – CALIBRAÇÃO DAS CÂMARAS DE SEDIMENTAÇÃO

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de Participação das Instituições e respectivos Representantes.

Tabela 2 – Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança L.C. (nível de confiança 95%).

Tabela 3 – Ampliação recomendada para contagem de diferentes classes de tamanho de fitoplâncton.

Tabela 4 – Resultados obtidos no exercício de análise do fitoplâncton.

Tabela 5 – Biovolumes (mm^3/l), SD (Desvio Padrão) e n (nº de participantes) referente a *Merismopedia* spp., *C. reticulatum* $<20 \mu\text{m}$ e *C. reticulatum* $>20 \mu\text{m}$.

Tabela 6 – Teste Mann Whitney para contagens de *Merismopedia* spp. em dois transeptos (2T) e seis transeptos (6T).

Fotografias: Leonor Cabeçadas

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** – Relação entre o nº de unidades taxonómicas e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).
- Fig. 2** – Processo de Sedimentação.
- Fig. 3** – Exemplos da distribuição de *Merismopedia* spp. na amostra da Albufeira do Alvito colhida em Junho de 2010.
- Fig. 4** – Resultados da análise quantitativa do Fitoplâncton Total (cel/ml).
- Fig. 5** – Resultados da análise quantitativa de Fitoplâncton Total (cel/ml) e das fracções de Nano e Micro fitoplâncton (cel/ml).
- Fig. 6** – Histograma relativo aos parâmetros **a)** Fitoplâncton Total (cel/ml) e **b)** Nano fitoplâncton (cel/ml).
- Fig. 7** – *Boxplots* **a)** Fitoplâncton Total (cel/ml) e **b)** Nano fitoplâncton (cel/ml).
- Fig. 8** – Carta de controlo dos resultados obtidos pelos participantes na análise quantitativa do Fitoplâncton Total (cel/ml).
- Fig. 9** – Resultados de abundância (cel/ml) de *Merismopedia* spp. (■) e *Coelastrum reticulatum* <20 µm (■).
- Fig. 10** – Resultados do biovolume (mm³/l) de *Merismopedia* spp. (■) e *Coelastrum reticulatum* <20 µm (■).
- Fig. 11** - Resultados de abundância (cel/ml) de *Coelastrum reticulatum* <20 µm (■) e *Coelastrum reticulatum* >20 µm (■).
- Fig. 12** – Resultados expressos em biovolume (mm³/l) de *Coelastrum reticulatum* <20 µm (■) e *Coelastrum reticulatum* >20 µm (■).
- Fig. 13** – Percentagem de desvio em relação à média para contagens de *Merismopedia* spp. (nº coenobia) em 2 transeptos com ampliação 400X (todos os participantes).
- Fig. 14** – Relação entre o nº de unidades taxonómicas *C. reticulatum* >20 µm (Micro fitoplâncton; contagens em 6 transeptos, 6T) e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

Fig. 15 - Relação entre o nº de unidades taxonómicas *Merismopedia* spp. (Nano fitoplâncton; contagens em 2 e 6 transeptos, 2T e 6T) e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

Fig. 16 - Relação entre o nº de unidades taxonómicas *C. reticulatum* <20 µm (Nano fitoplâncton; contagens em 6 transeptos, 6T) e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

Fig. 17 – Coeficiente de variação (%) referente a cada um dos participantes na contagem de Nano fitoplâncton (nº de unidades taxonómicas) com ampliação 400X.

Fig. 18 – Coeficiente de variação (%) referente a cada um dos participantes na contagem de Micro fitoplâncton (nº de unidades taxonómicas) na ampliação 200X.

1 – ENQUADRAMENTO

A análise quantitativa de amostras naturais de comunidades de fitoplâncton tem colocado uma série de problemas de solução complicada. Até à data os laboratórios vocacionados para a análise deste parâmetro têm utilizado no geral diversas variantes do método de Utermöhl. Contudo, com as exigências da implementação da Directiva Quadro da Água nos países europeus e especificamente em Portugal, há necessidade de proceder a uma harmonização de procedimentos relativos à quantificação do fitoplâncton baseados na técnica de Utermöhl segundo a Norma Europeia NE 15402, 2006.

Na sequência dos três Exercícios de Comparação Interlaboratorial (EIC) efectuados em parceria com as Instituições Instituto da Água, I.P., Agência Portuguesa do Ambiente e CIIMAR – Universidade do Porto, no âmbito do Projecto “Exercícios Interlaboratoriais de Fitoplâncton”, em 2009 e 2010, e dada a dispersão dos resultados obtidos, tornou-se evidente a necessidade de realizar um exercício recorrendo a uma amostra natural mas em condições controladas. Assim, no sentido de se tentar reduzir a variabilidade dos resultados obtidos entre participantes em relação à análise do fitoplâncton, foi organizado um exercício tendo como objecto uma amostra natural observada em condições controladas, sob coordenação da APA. A análise do fitoplâncton decorreu nas instalações do **Laboratório de Referência do Ambiente (LRA)** da APA de 4 de Abril a 9 de Maio de 2011, com a participação de 12 representantes de 11 Entidades (**Tabela 1**).

O método de contagem utilizado foi o de Utermöhl segundo a Norma Europeia NE 15402, 2006. De acordo com esta metodologia as amostras de água são preservadas e homogeneizadas manualmente. Uma alíquota da amostra é colocada numa câmara de contagem onde fica a sedimentar por um período de tempo adequado. São posteriormente identificadas e contadas as células de fitoplâncton presentes no fundo da câmara por microscopia de inversão.

Os passos normalmente mais subjectivos da análise tais como, i) volume de sedimentação, ii) identificação das espécies do fitoplâncton e iii) estratégia de contagem, foram estabelecidos de forma idêntica para todos os participantes.

2 – OBJECTIVOS

1. Realizar um **Exercício de análise quantitativa do fitoplâncton** com vista a comparar a variabilidade dos resultados entre os vários participantes.
2. Delinear um procedimento comum a adoptar nos próximos **Exercícios de Comparação Interlaboratorial (ECI)** e na análise de rotina do fitoplâncton, no sentido de minimizar potenciais fontes de variabilidade dos resultados entre analistas.

Tabela 1. Lista de Participação das Instituições e respectivos Representantes.

Nome do participante	Instituição participante
Carla Gameiro	Quimiteste – Engenharia e Tecnologia, S.A.
Cristina Costa	AquaExam, Lda.
Elisa Pereira	Nostoc – Laboratório de Investigação Biológica, Lda.
Leonor Cabeçadas	Agência Portuguesa do Ambiente
Manuel Carneiro	Águas do Douro e Paiva, S.A.
Micaela Vale	CIIMAR – Universidade do Porto
Paulo Pereira	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Sérgio Paulino	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
Sílvia Condinho	Águas do Algarve, S.A.
Sónia Gonçalves	Labelec – Estudos, Desenvolvimento e Actividades Laboratoriais, S.A.
Susana Nunes	Laboratório da Água da Universidade de Évora
Vitor Gonçalves	Direcção de Serviços dos Recursos Hídricos/Universidade dos Açores

3 – PLANEAMENTO DO EXERCÍCIO DE ANÁLISE DO FITOPLÂNCTON

3.1 – Fundamentos teóricos do método utilizado

Considerando que o método de Utermöhl se baseia no pressuposto de que as células de fitoplâncton se distribuem no fundo da câmara de sedimentação segundo a distribuição de POISSON, a precisão da quantificação é dada pela seguinte equação:

$$(1) \text{ Precisão \%} = \frac{2 * 100}{\sqrt{n^{\circ} \text{ de células contadas}}}$$

Para uma estimativa de contagem do fitoplâncton considerada estatisticamente aceitável, recomenda-se a contagem de pelo menos **50 unidades** de cada um dos *taxon* dominantes (**células, colónias/coenobia** ou **filamentos**), devendo a contagem total atingir os **500 indivíduos** (Venrick, 1978). A relação entre o nº de unidades contadas e a precisão é mostrada na **Tabela 2** e **Fig. 1**.

Tabela 2. Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança L.C., (nível de confiança 95%) (Anderson & Thröndsen 2003).

Nº de unidades taxonómicas contadas	L.C. 95% (± %)	Intervalo nº de unidades de contagem
4	100	0-8
5	89	1-10
7	76	2-12
10	63	4-16
15	52	7-23
20	45	11-29
25	40	15-35
40	32	27-53
50	28	36-64
75	23	58-92
100	20	80-120
200	14	172-228
400	10	360-440
500	8,9	456-545
700	7,6	647-753
1000	6,3	937-1063
2000	4,5	1910-2090
5000	2,8	4858-5143
10000	2	9800-10200

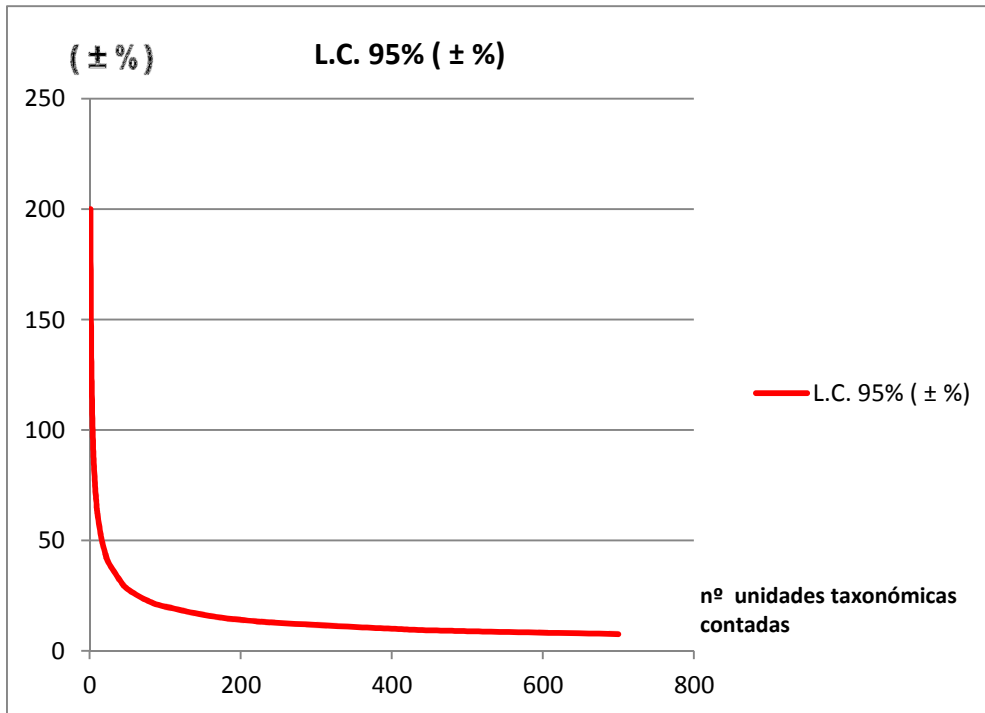


Fig. 1 - Relação entre o nº de unidades taxonómicas contadas e o limite de confiança L.C., (nível de confiança 95%).

3.2 – Critérios adoptados para controlo das fontes de variabilidade associadas à análise do fitoplâncton

Com o objectivo de diminuir o maior número possível de fontes de variabilidade entre os resultados dos participantes, foram fixadas várias condições:

- volume da alíquota da amostra,
- homogeneização da alíquota da amostra,
- calibração da câmara de sedimentação,
- tempo de sedimentação da câmara de contagem,
- marca e modelo do microscópio de inversão,
- factores de calibração para a escala da ocular,
- estratégia de contagem,
- selecção de unidades taxonómicas,
- nº médio de células por *coenobium*/colónia e por filamento
- factores de conversão para cálculo da concentração do fitoplâncton.

Para simplificação do exercício, a identificação do fitoplâncton ficou limitada às unidades taxonómicas seleccionadas (ver capítulo 3.4.7). Estas foram previamente revistas (cerca de ½ hora) individualmente com cada um dos participantes, recorrendo a imagens de computador, antes de procederem à contagem por microscopia de inversão.

As unidades taxonómicas foram seleccionadas segundo os seguintes critérios:

1 – representativas da fracção do Micro e Nano fitoplâncton, segundo o critério da seguinte tabela :

Tabela 3 - Ampliação recomendada para a contagem de diferentes classes de tamanho de fitoplâncton (Anderson & Thröndsen 2003).

Classe de tamanho de fitoplâncton	Ampliação
2 – 20 µm (Nano fitoplâncton)	200 – 400X
>20 µm (Micro fitoplâncton)	100 – 200X

2 – representativas de células solitárias, colónias, *coenobia* e filamentos,

3 – representativas dos principais grandes grupos presentes na amostra (Cyanobacteria, Chlorophyceae, Cryptophyceae, Bacillariophyceae, Conjugatophyceae),

4 – representativas de duas classes de tamanho de uma mesma espécie incluindo.

3.3 - Cálculo da concentração de fitoplâncton

A conversão das contagens de fitoplâncton na respectiva concentração (densidade/abundância) foram, para um determinado volume de amostra (normalmente litro ou mililitro,) obtidas através das seguintes equações:

$$(2) \quad C, \text{ Células l}^{-1} = N \times \left(\frac{At}{Ac} \right) \times \frac{1000}{V}$$

$$(3) \quad C, \text{ Células ml}^{-1} = N \times \left(\frac{At}{Ac} \right) \times \frac{1}{V}$$

Onde:

C = Concentração (densidade/abundância) das espécies fitoplanctónicas (respectivamente Células l⁻¹ e Células ml⁻¹)

V = volume da câmara de contagem (ml)

At = área total da câmara de contagem (mm²)

Ac = área contada da câmara de contagem (mm²)

N = nº de células das espécies contadas

3.4 – Síntese do Procedimento adoptado.

(Método de Utermöhl, segundo a NE 15204, 2006)

Foi preparada a amostra **B – Alvito**, de Junho de 2010, em triplicado. Os participantes foram divididos em três grupos e cada grupo analisou 1 dos replicados na mesma câmara de sedimentação (**Tabela 4**).

3.4.1 – Homogeneização e Sedimentação da amostra

Após homogeneização da amostra B (durante 1 min), uma alíquota foi colocada a sedimentar numa câmara de contagem previamente calibrada por pesagem (ver Anexo).

Para evitar a formação de bolhas de ar na câmara de sedimentação colocou-se próximo uma caixa de Petri com água tendo sido ambas cobertas com caixa de plástico, forrada com papel de filtro humedecido (**Fig. 2**).

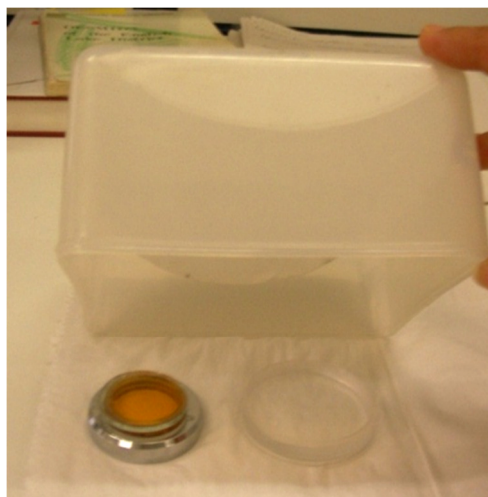


Fig. 2 – Processo de Sedimentação.

3.4.2 – Volume da amostra

Volume de amostra sedimentada = 2,4 ml

3.4.3 – Área da câmara de sedimentação

Área do fundo da câmara (A) = $\pi/4 \cdot d^2$

onde

d = diâmetro interno da câmara de sedimentação d = 25 mm

A = 491 mm²

3.4.4 – Marca e modelo do Microscópio

Foi utilizado um Microscópio de inversão **WILD M40**, equipado com contraste de fase, cabeça binocular com ampliação de 1,4X e oculares 10X uma delas com escala numérica verificada com micrómetro calibrado e a outra equipada com sistema regulável de linhas. Foram utilizadas as objectivas Ph 20X e 40X.

Para simplificação, as ampliações utilizadas no decorrer da análise serão referidas como 200X e 400X, correspondendo contudo, respectivamente às ampliações 280X e 560X.

3.4.5 – Estratégia de contagem

A contagem do fitoplâncton foi feita através de transeptos. Foram observados 6 transeptos com ampliação 200X correspondendo a 11% da área do fundo da câmara (54 mm²) e 6 transeptos com ampliação 400X correspondendo a 6% da área do fundo da câmara (27 mm²).

3.4.6 – Factores de conversão

Para o cálculo da concentração do fitoplâncton em número de células por mililitro utilizou-se a equação (3), tendo sido obtidos respectivamente os factores de conversão 3795 e 7506, para 6 transeptos com ampliações de 200X e 400X.

3.4.7 – Unidades taxonómicas seleccionadas ¹:

- em ampliação 200X

- *Aphanizomenon* sp. – filamento (21 células/filamento)
- *Woronichinia* spp. – colónia (128 células/colónia)
- *Coelastrum reticulatum*² – *coenobium* >20 µm (32 células/*coenobium*)
- Chlorococcales coloniais – colónia >20 µm (7 células/colónia)
- *Closterium aciculare* – célula solitária
- *Closterium acutum* var. *variable* – célula solitária
- *Cosmarium* spp. – célula solitária
- *Staurastrum* spp. – célula solitária

¹ O nº médio de células por filamento, colónia e/ou *coenobium* foi calculado com base em 30 unidades taxonómicas, n=30.

² Para a espécie *Coelastrum reticulatum* distinguiram-se duas classes de tamanho (*coenobium* >20 µm e *coenobium* <20 µm) quantificadas cada uma delas em ampliações diferentes, respectivamente 200X e 400X.

- *Cryptomonas obovata* - célula solitária

- em ampliação 400X

- *Merismopedia* spp. – coenobium (4 células/coenobium)
- *Coelastrum reticulatum*² – coenobium <20 µm (16 células/coenobium)
- *Crucigenia* spp. – coenobium (4 células/coenobium)
- *Oocystis* spp. – coenobium (4 células/coenobium)
- *Tetraedron* spp. – célula solitária
- Chlorococcales não coloniais <20 µm – célula solitária
- Chlorococcales coloniais <20 µm (5 células/colónia)
- *Cyclotella* spp. – célula solitária
- *Chroomonas acuta* – célula solitária
- Nanofitoflagelados não identificados – célula solitária

3.4.8 - Tempo de análise da amostra

O tempo médio de análise da amostra foi de cerca de 3 horas no total, tendo sido dispendido cerca de 1 h para a observação dos 6 transeptos com ampliação 200X e cerca de 2 h para a observação dos 6 transeptos com ampliação 400X.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Fig. 3** mostra-se o aspecto geral da **Amostra B – Alvito** colhida em Junho de 2010. A abundância de *Merismopedia* spp. na amostra original foi de cerca de 5 000 cel/ml, enquanto que na amostra observada um ano depois neste exercício, foi de cerca de 50 000 cel/ml. Considerando que o volume da amostra utilizado neste exercício (2,4 ml) foi bastante inferior ao utilizado na análise anterior da amostra (10 ml), é plausível que a espécie tenha passado despercebida na 1ª análise, devido às suas diminutas dimensões, eventualmente mascarada pela abundância das espécies de dimensões superiores. Contudo, exprimindo os resultados em biovolume obtêm-se respectivamente 0,001 e 0,006 mm³/l.

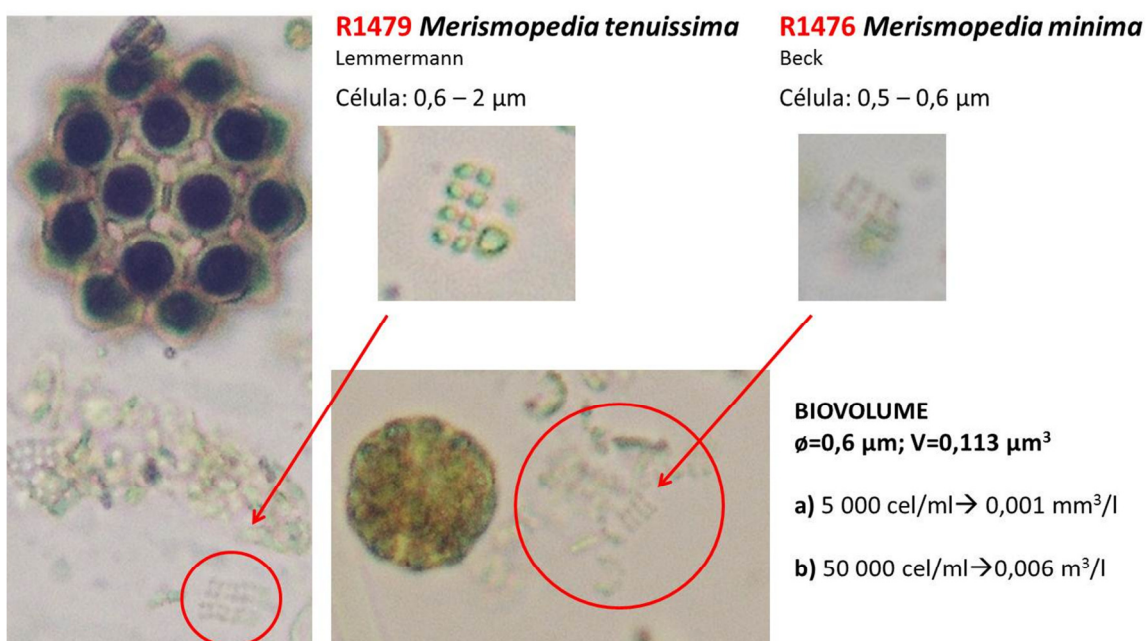


Fig. 3 - Exemplos da distribuição de *Merismopedia* spp. na amostra da Albufeira do Alvito em Junho de 2010.

Obtiveram-se as seguintes concentrações em biovolume de *Merismopedia* spp. calculadas respectivamente para: **a)** amostra original de Junho de 2010 - 0,001 mm³/l e **b)** amostra analisada no exercício de Abril/Maio de 2011 - 0,006 mm³/l.

4.1 – Abundância do fitoplâncton

Os participantes examinaram 6 transeptos com ampliação 200X e 6 transeptos com ampliação 400X. Contudo, devido a restrições de tempo, 4 dos participantes usaram a estratégia de contagem definida na **Tabela 4**.

Os resultados referentes à análise quantitativa de **Fitoplâncton Total** obtidos pelos participantes variaram entre 33 285 cel/ml (Lab1110) e 106 004 cel/ml (Lab1105[&]) com valores de média, mediana e desvio padrão (SD) respectivamente de 63 132, 59 651 e 17 842 cel/ml (**Fig. 4**). Os resultados da análise da amostra natural de fitoplâncton sob condições controladas encontram – se representados nas **Figs. 5, 6 a) e b), 7 a) e b)**, e na **Tabela 4**.

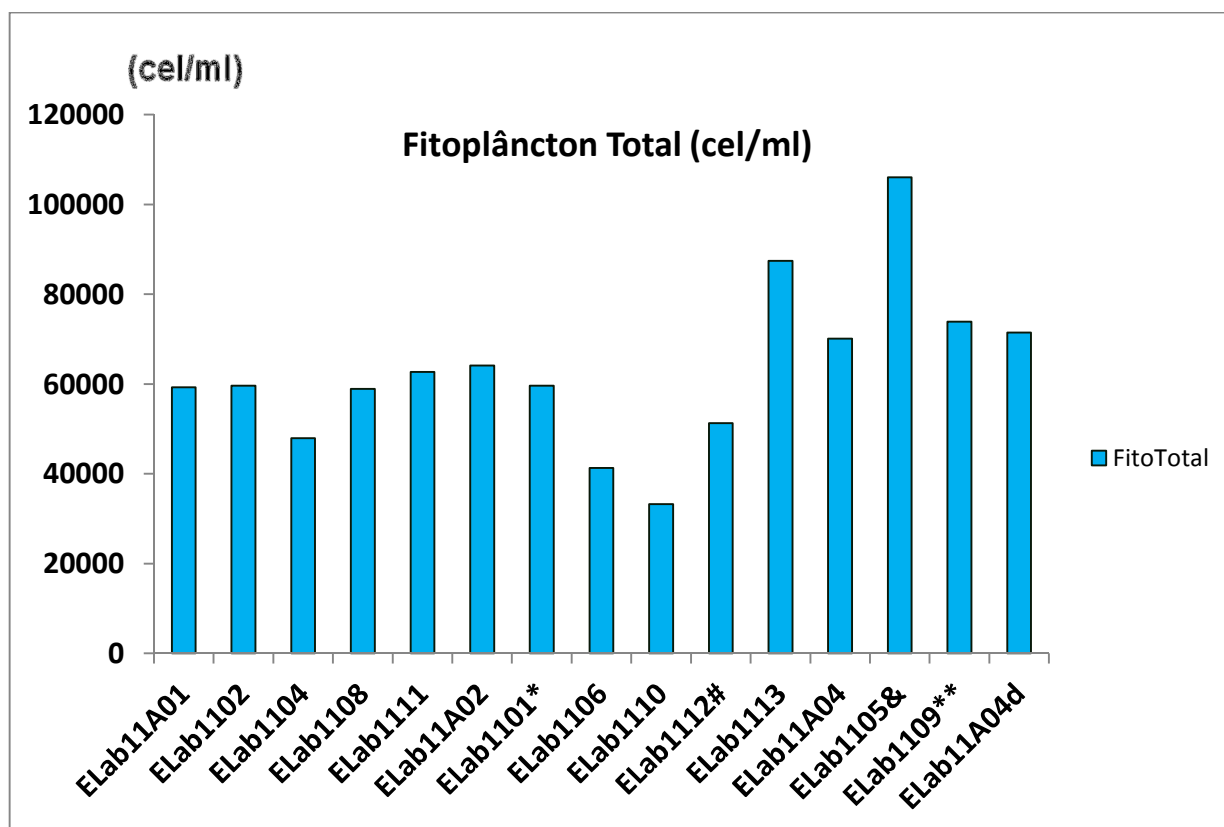


Fig. 4 – Resultados referentes à análise quantitativa do Fitoplâncton Total (cel/ml).

4.1.1 – Abundância relativa das fracções do Fitoplâncton Total

Observou-se que em termos numéricos a fracção de **Nano** fitoplâncton foi dominante em relação à do **Micro** fitoplâncton, (**Fig. 5**) com valores que variaram entre 28 845 (cel/ml) (Lab1110) e 88 578 (cel/ml) (Lab1105[&]).

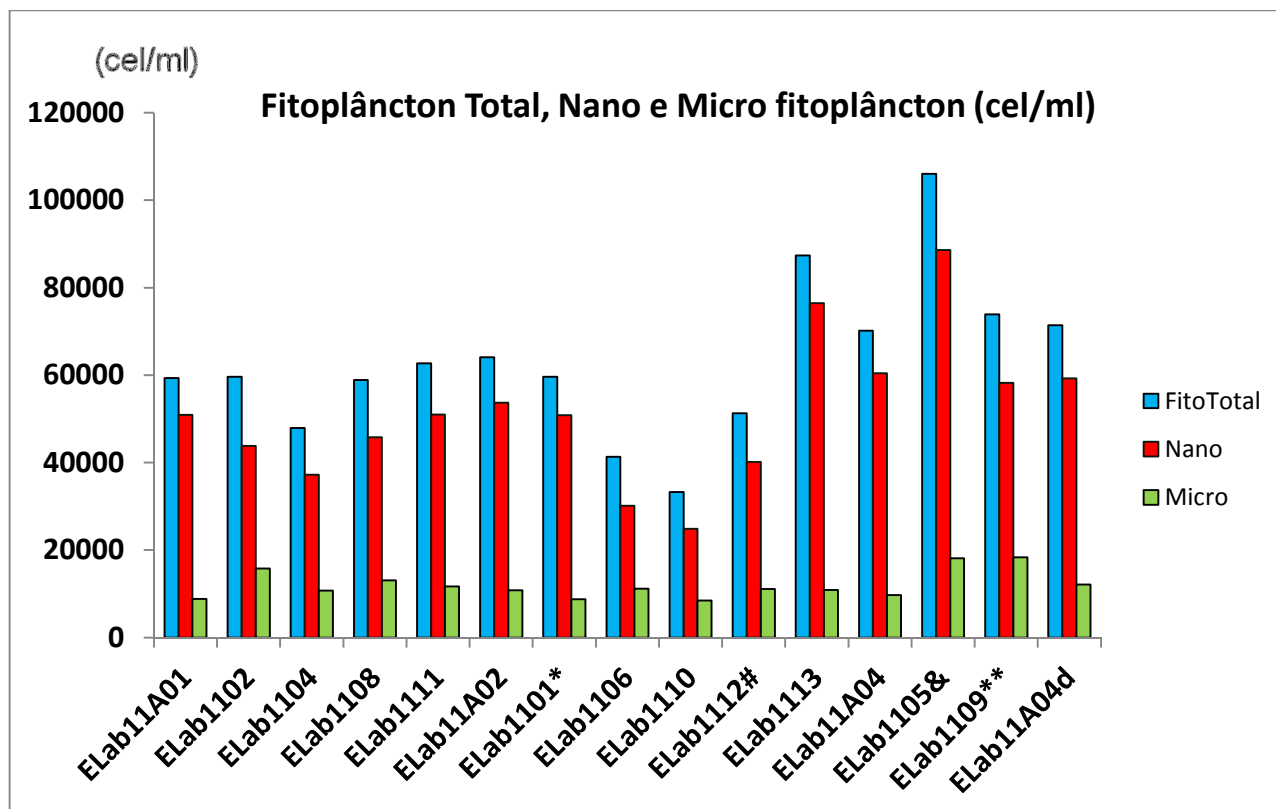


Fig. 5 – Resultados referentes à análise quantitativa de Fitoplâncton Total (cel/ml) e respectivas fracções de Nano e Micro fitoplâncton (cel/ml).

Os resultados referentes à análise de Fitoplâncton Total (cel/ml) e fracção do Nano fitoplâncton (cel/ml) apresentaram uma distribuição normal como se pode observar nos histogramas das **Fig. 6 a)** e **b)**. Assim, foram utilizados procedimentos de estatística descritiva na análise dos resultados.

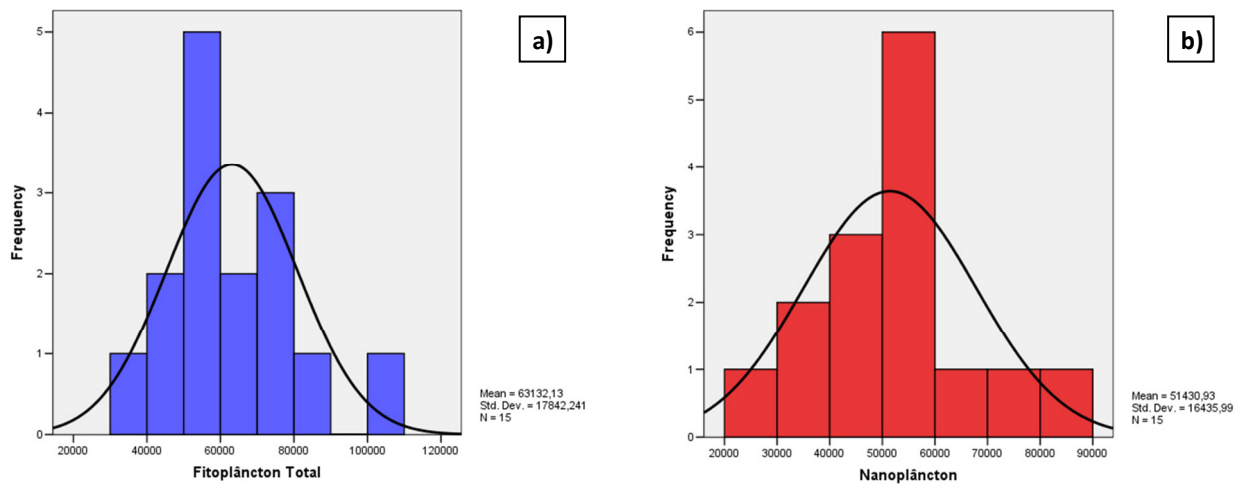


Fig. 6 – Histogramas relativos aos resultados obtidos por todos os participantes para os parâmetros **a)** Fitoplâncton Total (cel/ml) e **b)** Nano fitoplâncton cel/ml).

O Coeficiente de Variação em percentagem (CV%) obtido para os resultados de abundância de Fitoplâncton Total (cel/ml) entre participantes foi de **28%** (n=15) (**Tabela 4**), sendo cerca de 8% atribuído à variabilidade inerente ao triplicado.

Deste modo pode considerar-se que este exercício conduziu a bons resultados, apresentando um CV% entre participantes da mesma ordem de grandeza do indicado por Rott *et al.*, (2007) correspondente a um exercício mais simplificado do que o exercício realizado, em que foram quantificadas apenas 4 espécies na amostra natural.

Tabela 4 – Resultados obtidos pelos participantes no exercício de análise do fitoplâncton.

Participante	FitoTotal (cel/ml)	Nano (cel/ml)	Micro (cel/ml)	Calendarização
ELab11A01	59 298	50 883	8 842	<i>1ª semana</i> Replicado – 1 n=5
ELab1102	59 638	43 820	15 818	
ELab1104	47 951	37 222	10 728	
ELab1108	58 925	45 817	13 108	
ELab1111	62 700	50 981	11 719	
ELab11A02	64 093	53 698	10 801	<i>2ª semana</i> Replicado – 2 n=6
ELab1101*	59 651	50 869	8 782	
ELab1106	41 302	30 122	11 180	
ELab1110	33 285	24 845	8 440	
ELab1112 [#]	51 275	40 175	11 100	
ELab1113	87 395	76 494	10 865	
ELab11A04	70 131	60 423	9 708	<i>3ª semana</i> Replicado – 3 n=4
ELab1105 ^{&}	106 004	88 578	18 144	
ELab1109**	73 900	58 262	18 336	
ELab11A04d	71 434	59 275	12 144	
Média	63 132	51 431	11 981	
SD	17 842	16 436	3 138	
CV%	28	32	26	
N	15	15	15	
Mediana	59 651	50 883	11 100	

Legenda da Tabela 4: * 2T 400X; [#] 3T 400X; [&] 2T 400X; ** 5T 200X; 4T 400X

4.1.2 – BoxPlots

Recorreu-se a *BoxPlots* (Fig. 7 a) e b)) para apresentar os resultados referentes ao Fitoplâncton Total (cel/ml) e Nano fitoplâncton (cel/ml) sendo de destacar um *outlier* (Lab1105[&]) em ambos os casos. Esta informação confirma os bons resultados indicados pela distribuição normal observada nos histogramas e pelo CV%=28 (n=15), obtido para os resultados entre os vários participantes.

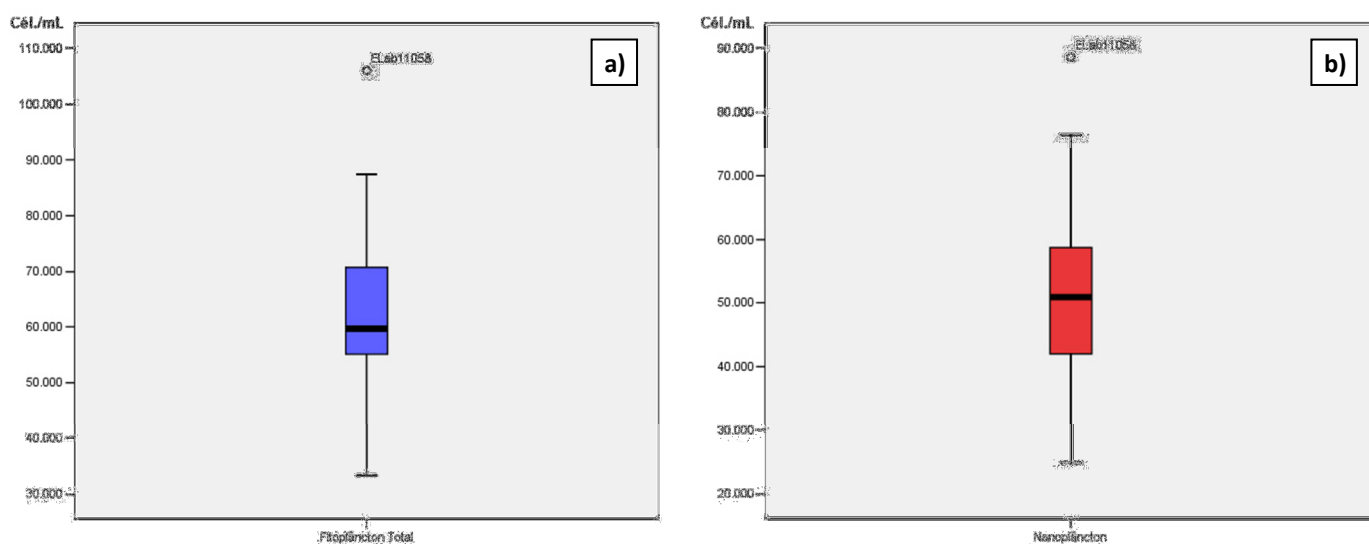


Fig. 7 – *Boxplot* para a) Fitoplâncton Total (cel/ml) e b) Nano fitoplâncton (cel/ml) incluindo todos os participantes.

4.1.3 – Carta de Controlo

Representando os resultados de Fitoplâncton Total (cel/ml) numa carta de controlo (Fig. 8) verifica-se que todos os valores estão contidos no intervalo definido pelos Limites Superior e Inferior de Controlo (LSC; LIC; $\pm 3SD$). Apenas um ponto se encontra no Limite Superior de Aviso (LSA, LIA; $\pm 2SD$) que corresponde ao *outlier* observado no *BoxPlot* da Fig. 7 a).

Salienta-se que a média foi calculada, com base nos resultados obtidos por todos os participantes (63 132 cel/ml). Esta média $\pm 2SD$ correspondeu a 27448 e 98811 cel/ml e $\pm 3SD$ correspondeu a 9 607 e 116 651 cel/ml. (SD = Desvio Padrão em relação à média).

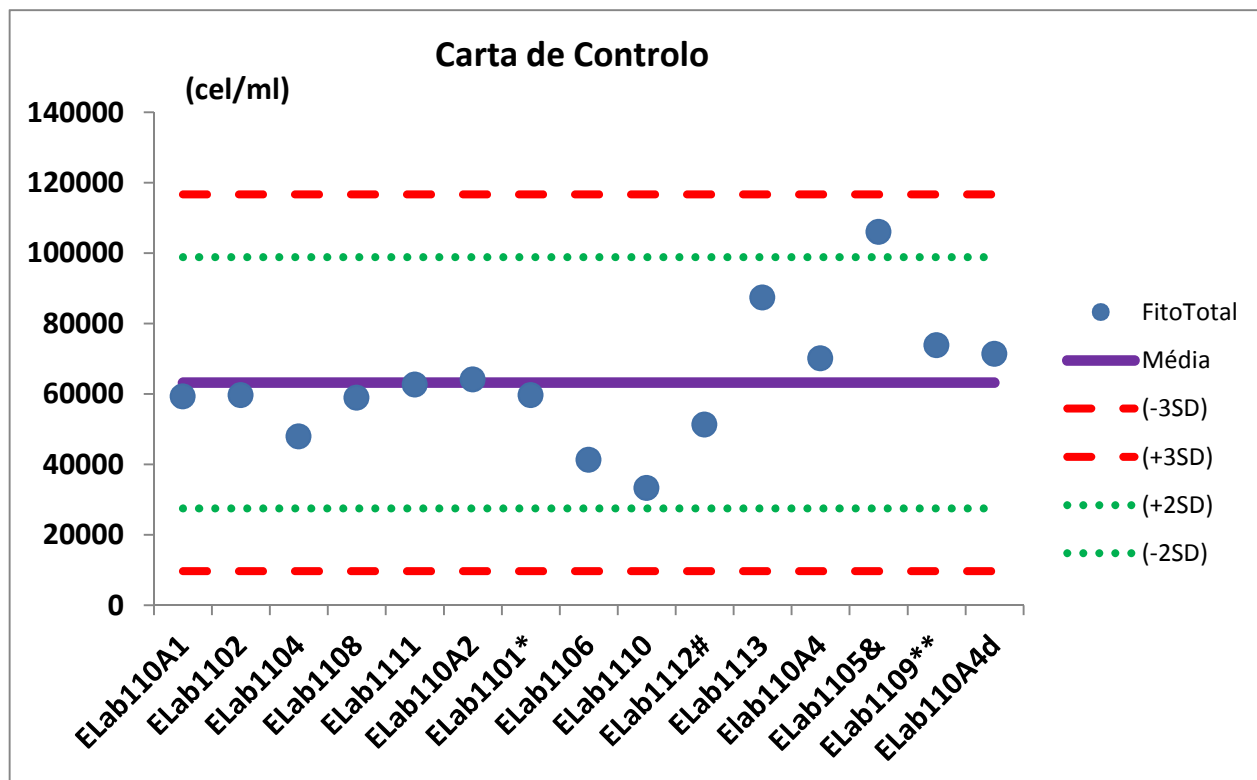


Fig. 8 – Carta de Controle referente aos resultados obtidos pelos participantes na análise quantitativa de Fitoplâncton Total (cel/ml).

4.1.4 – Relação Abundância vs Biovolume

Os resultados representados nas Fig.s 9, 10, 11 e 12 ilustram a importância relativa em termos de **abundância (cel/ml)** e **biovolume (mm³/l)** dos *taxa* mais importantes respectivamente, do **Nano** fitoplâncton (*Merismopedia* spp. e *Coelastrum reticulatum* <20 µm) e do **Micro** fitoplâncton (*C. reticulatum* >20 µm).

Verificou-se que em termos numéricos de **abundância** a fracção do **Nano** fitoplâncton foi dominada por *Merismopedia* spp. sendo a presença da espécie *C. reticulatum* <20 µm quase residual (Fig. 9).

Contudo, em termos de **biovolume**, como se pode ver na Fig.10, há uma inversão da importância relativa das duas componentes do **Nano** fitoplâncton, neste caso dominando *C. reticulatum* <20 µm.

Se compararmos as duas classes de tamanho de *C. reticulatum* expressas em **abundância** pode verificar-se que apresentaram valores da mesma ordem de grandeza, 5 655 e 7 044 cel/ml respectivamente, para *C. reticulatum* <20 µm (Nano fitoplâncton) e *C. reticulatum* >20 µm (Micro fitoplâncton) (Fig. 11).

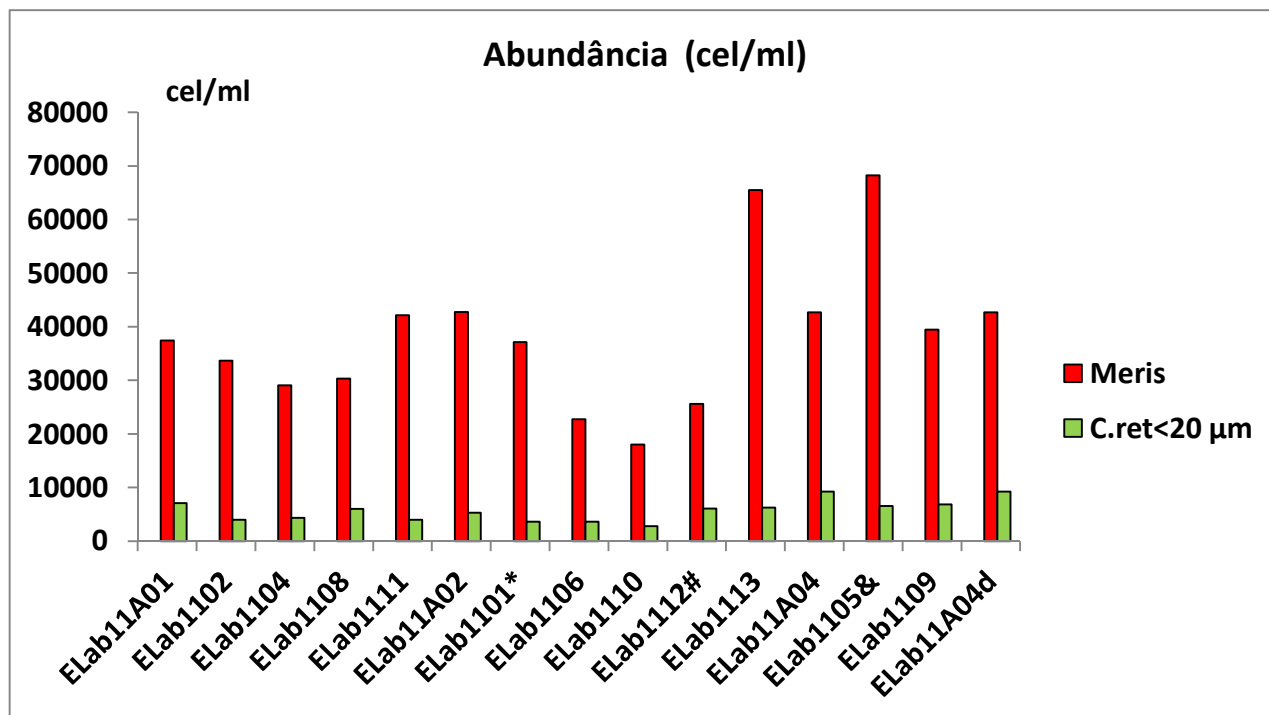


Fig. 9 - Resultados de abundância (cel/ml) para *Merismopedia* spp. (■) e *Coelastrum reticulatum* <20 μm (■) incluindo todos os participantes.

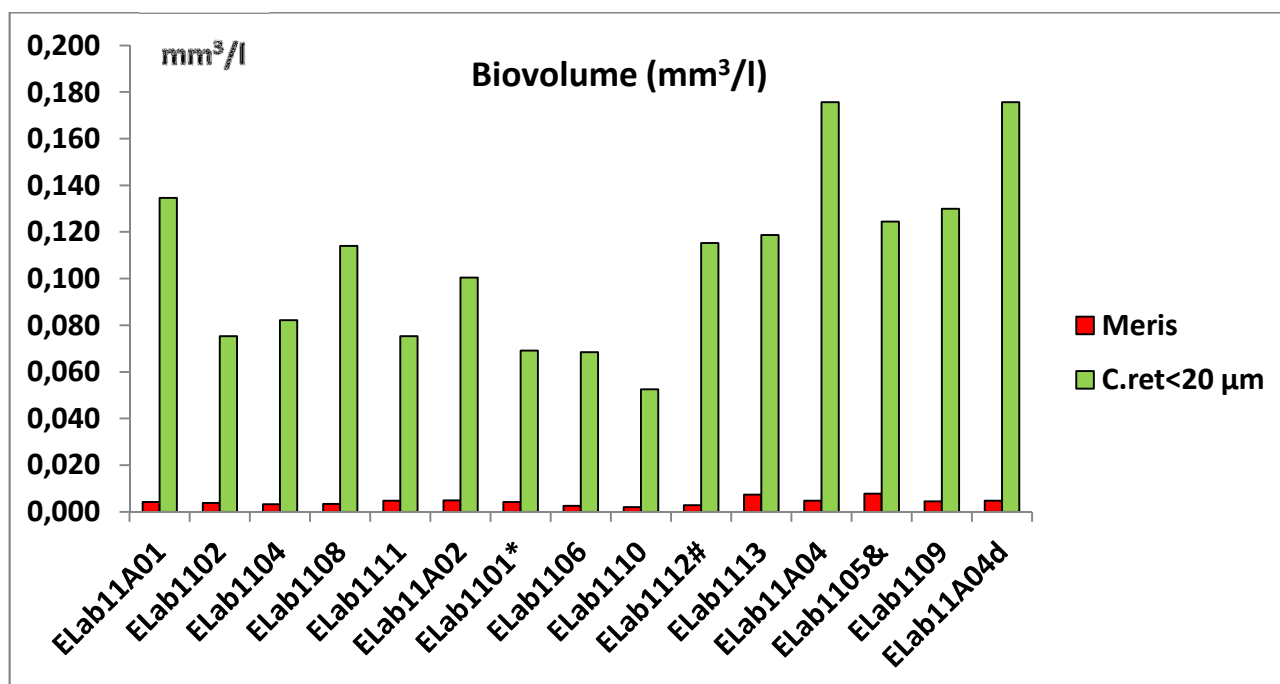


Fig. 10 – Resultados expressos em biovolume (mm³/l) para *Merismopedia* spp. (■) e *Coelastrum reticulatum* <20 μm (■) incluindo todos os participantes.

Contudo, em termos de biovolume a importância de *Merismopedia* spp. revelou-se negligenciável em relação a *C. reticulatum* <20 µm, que por sua vez foi pouco importante em relação a *C. reticulatum* >20 µm (**Fig.s 10 e 12**).

Se considerarmos os valores médios de biovolume calculados com base nos resultados de todos os participantes (**Tabela 5**) pode-se observar a forte disparidade em termos de importância relativa entre os componentes do **Nano** fitoplâncton (*Merismopedia* spp. e *C. reticulatum* <20 µm) e do **Micro** fitoplâncton (*C. reticulatum* >20 µm) quando expressos em biovolume.

Tabela 5. – Biovolume (mm³/l), SD (Desvio Padrão) e n (nº de participantes) referentes a *Merismopedia* spp., *C. reticulatum* <20 µm e *C. reticulatum* >20 µm.

	<i>Merimopedia</i> spp.	<i>C. reticulatum</i> <20 µm	<i>C. reticulatum</i> >20 µm
Biovolume (mm ³ /l)	0,004	0,11	0,67
SD	0,002	0,04	0,25
n	15	15	15

O biovolume de *C. reticulatum* >20 µm (0,67 mm³/l) revelou ser cerca de 6 vezes o de *C. reticulatum* <20 µm (0,11 mm³/l), por sua vez cerca de 55 vezes o de *Merismopedia* spp. (0,004 mm³/l), o que implica que o biovolume de *C. reticulatum* >20 µm foi de cerca de 300 vezes o de *Merismopedia* spp.

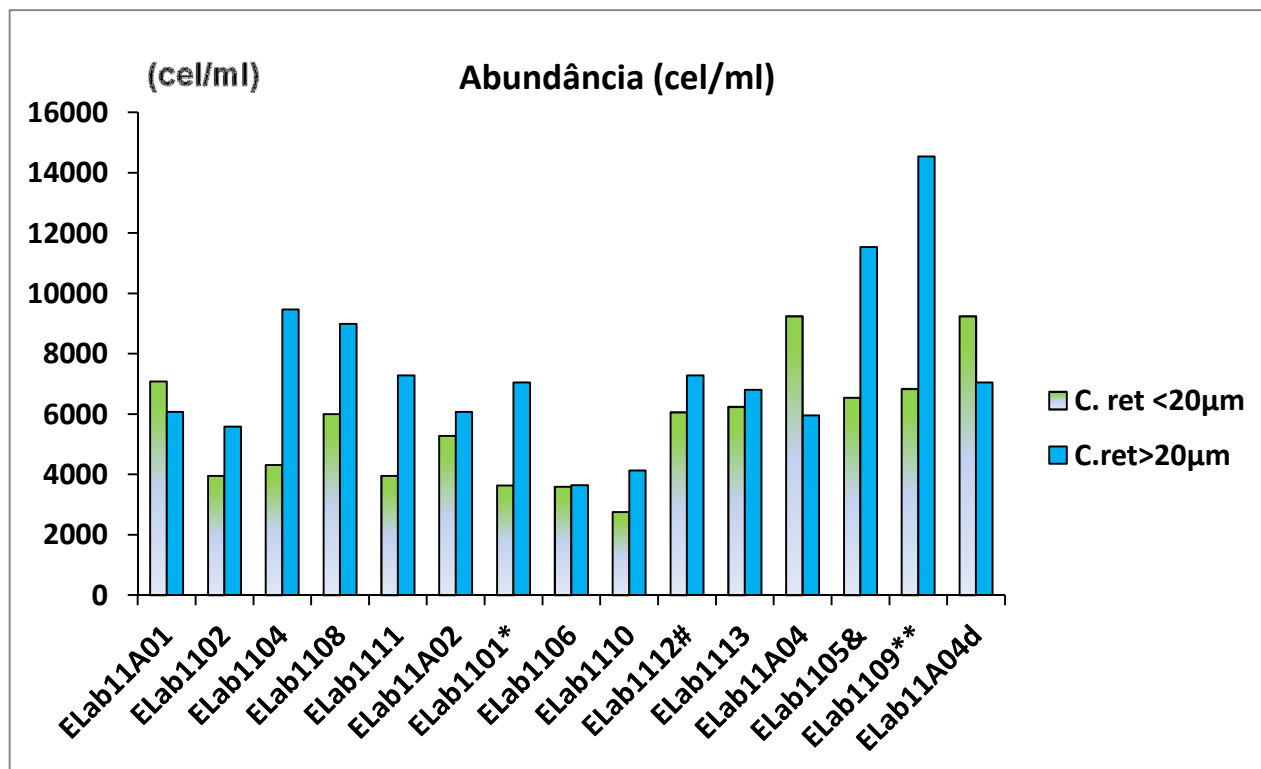


Fig. 11 - Resultados de abundância (cel/ml) de *Coelastrum reticulatum* <20 µm (■) e *Coelastrum reticulatum* >20 µm (■) incluindo todos os participantes.

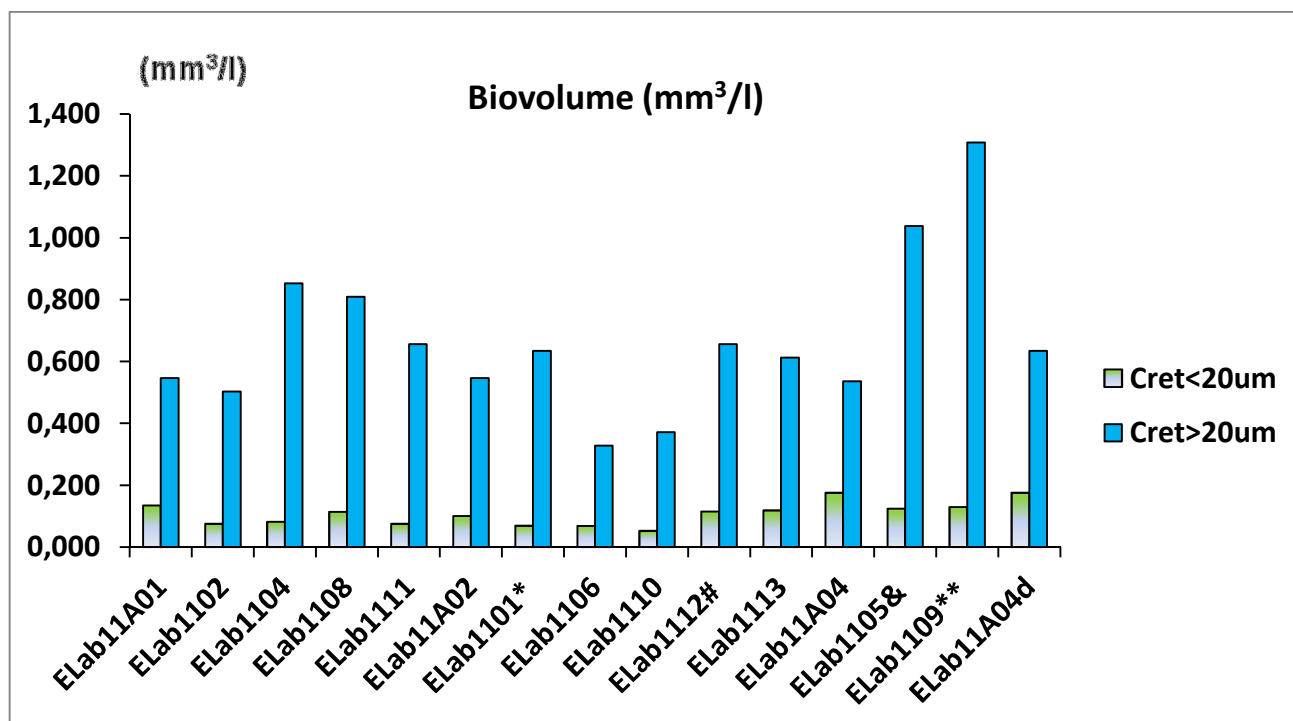


Fig. 12 – Resultados expressos em biovolume (mm³/l) de *Coelastrum reticulatum* <20 µm (■) e *Coelastrum reticulatum* >20 µm (■) incluindo todos os participantes.

4.2 – Esforço de Contagem vs Precisão

4.2.1 – Teste-U não paramétrico Mann-Whitney

Com o objectivo de avaliar o esforço de contagem vs a precisão de contagem, foi realizado um Teste-U não paramétrico Mann-Whitney para os resultados obtidos pelos participantes, correspondente às contagens de *Merismopedia* spp. (cel/ml) em dois transeptos (2T) e em seis transeptos (6T) com ampliação 400x (**Tabela 6**). Verificou-se que as contagens das duas amostras não são significativamente diferentes ($P \geq 0,05$, bi-caudal).

Tabela 6 - Teste-U não paramétrico Mann-Whitney para as contagens de *Merismopedia* spp. (cel/ml) em 2 transeptos 400X vs 6 transeptos 400X (todos os participantes).

n_1	n_2	U	P (bi-caudal)	P (uni-caudal)
15	11	87	0,838442	0,419221
normal aprox. $z = 0,23355$			0,815334*	0.407667*

É de salientar que um esforço de contagem acima de um certo patamar (ex. 500 células, *coenobia*/colónias e filamentos) não se traduz necessariamente num aumento significativo de precisão (**Fig.13**).

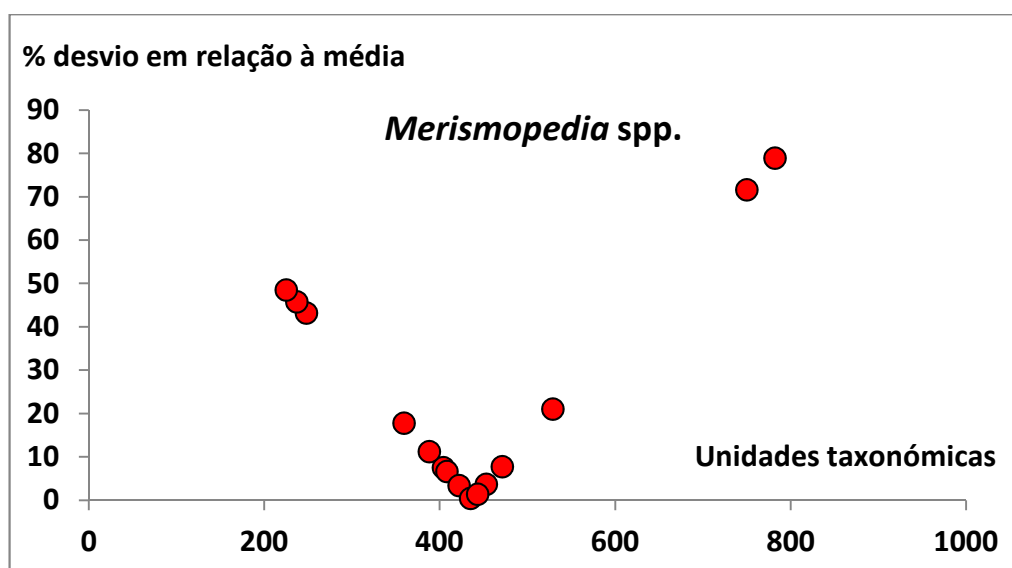


Fig. 13 - Percentagem de desvio em relação à média para contagens de *Merismopedia* spp. (nº *coenobia*) em 2 transeptos (2T), com ampliação 400X (todos os participantes).

4.2.2 – Erros estatísticos associados à contagem

Numa análise do fitoplâncton os erros estatísticos inerentes à contagem condicionam a área na qual o verdadeiro valor reside com um grau de probabilidade de 95%. O erro estatístico de contagem pode ser calculado segundo a função que está representada nas **Fig. 1** e **Tabela 2**.

Considerando os resultados obtidos pelos participantes com ampliação com ampliação 200X (Micro fitoplâncton), verificou-se que o erro de contagem variou entre $\pm 16\%$ (ELab1105) e $\pm 26\%$ (ELab1106) e o nº médio de unidades taxonómicas contadas traduziu-se por um erro de $\pm 19\%$.

As unidades de contagem para um *taxon* importante na amostra (em termos de abundância e biovolume), por ex. de *C. reticulatum* $>20 \mu\text{m}$ variaram entre 30 (ELab1106) e 100 (ELab1109**), com um nº médio de 60 unidades de contagem. Como se pode ver na **Fig. 14** a contagem de 6 transeptos nesta ampliação, pode ser considerada suficiente, pelo menos para a maioria dos participantes.

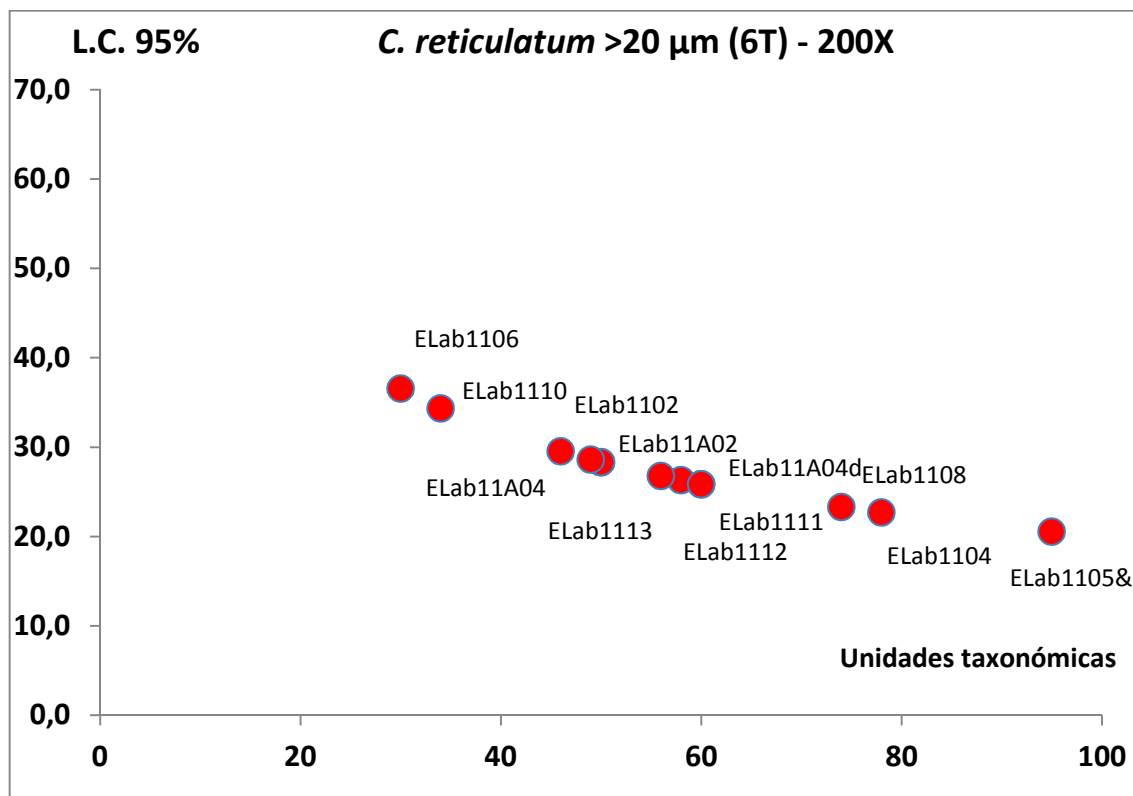


Fig. 14 – Relação entre o nº de unidades taxonómicas *C. reticulatum* $>20 \mu\text{m}$ (Micro fitoplâncton; contagens em 6 transeptos, 6T) e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

Com ampliação de 400X (Nano fitoplâncton) o erro de contagem variou entre $\pm 4\%$ (ELab1113) e $\pm 8\%$ (ELab1101) e o número médio de unidades taxonómicas contadas

traduziu-se por um erro de $\pm 5\%$. As contagens referentes à unidade taxonómica *Merismopedia* spp. (4 cel/coenobium) variaram entre 601 (ELab1110) e 2 182 (ELab1113) com um nº médio de 1 207. Todos os participantes, incluindo os que contaram 2 e 3 transeptos registaram valores de L.C. 95% inferiores a 20%. Conclui-se pois, que para esta unidade taxonómica, 2 a 3 transeptos teriam sido suficientes para uma contagem estatisticamente significativa (Fig. 15).

Contudo para o *taxon C. reticulatum* <20 μm as contagens variaram entre 23 (ELab1110) e 61 (ELab11A04d) com um nº médio de 39. Os participantes que contaram 2 e 3 transeptos registaram valores elevados de L.C. 95%. Como se pode ver na Fig. 16 para se obterem números estatisticamente significativos para este *taxon* torna-se necessário a contagem de 6 transeptos.

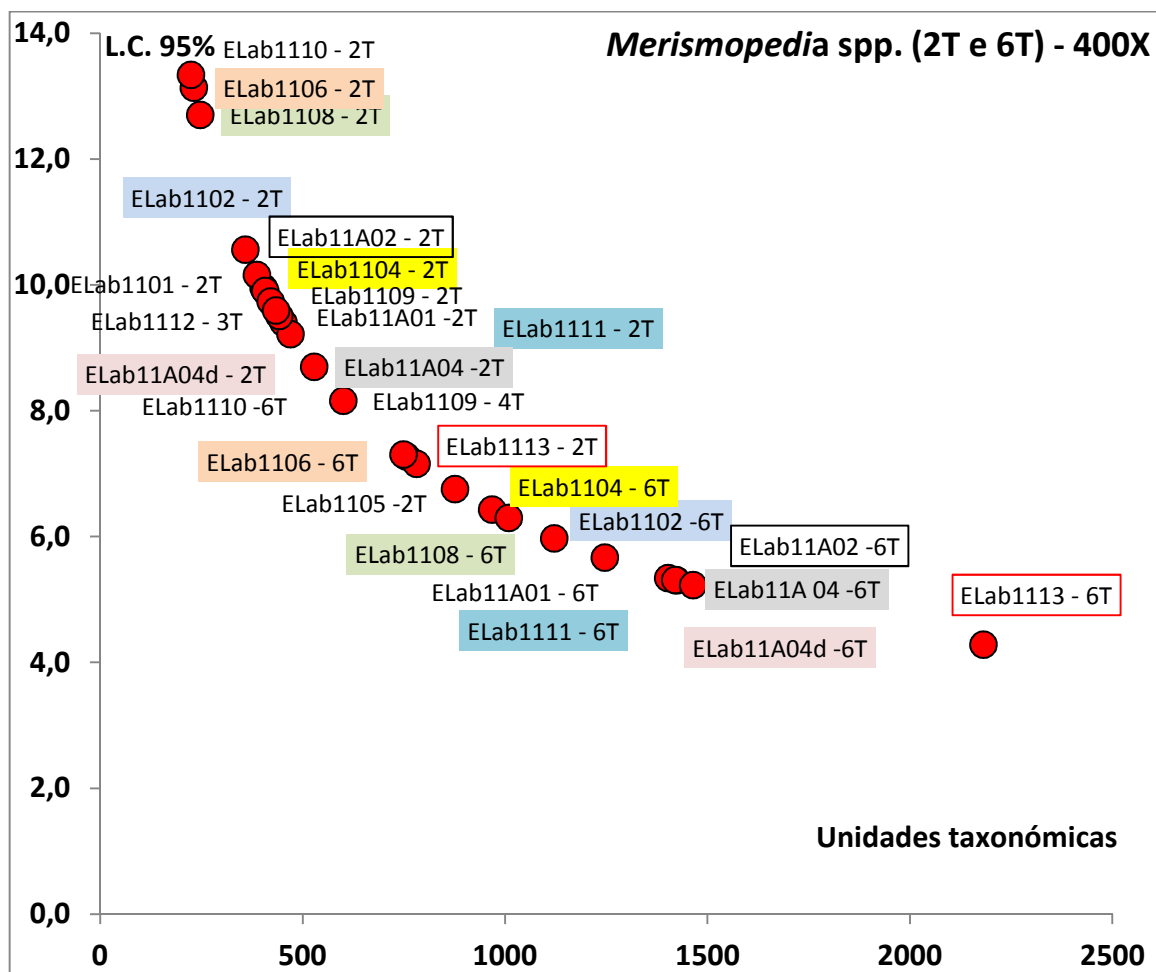


Fig. 15 - Relação entre o nº de unidades taxonómicas *Merismopedia* spp. (Nano fitoplâncton; contagens em 2 e 6 transeptos, 2T e 6T) e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

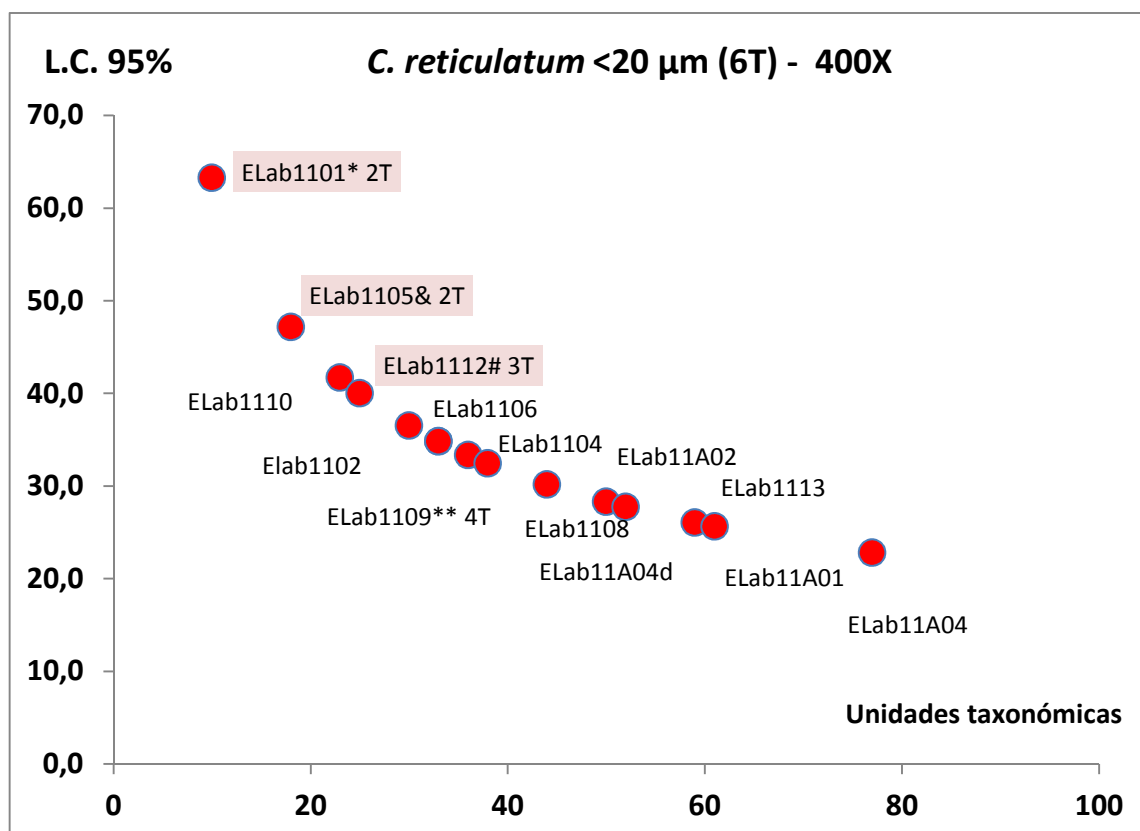


Fig. 16 - Relação entre o nº de unidades taxonómicas *C. reticulatum* <20 μm (Nano fitoplâncton; contagens em 6 transeptos, 6T) e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

4.2.3 – Coeficiente de Variação

O Coeficiente de Variação em percentagem (CV%) referente a cada participante, respectivamente para as contagens de Fitoplâncton (nº de unidades taxonómicas) nas ampliações 400X (Nano fitoplâncton) e 200X (Micro fitoplâncton), pode ser observado nas **Figs. 17 e 18**.

Verificou-se que o CV de cada um dos participantes variou entre 3% (Lab1105[&]) e 33% (Lab1106) com um valor médio de 16% para a ampliação 400X, e variou entre 10% (ELab110A4) e 30% (Lab1101* e Lab1112[#]) com um valor médio de 21% para a ampliação 200X.

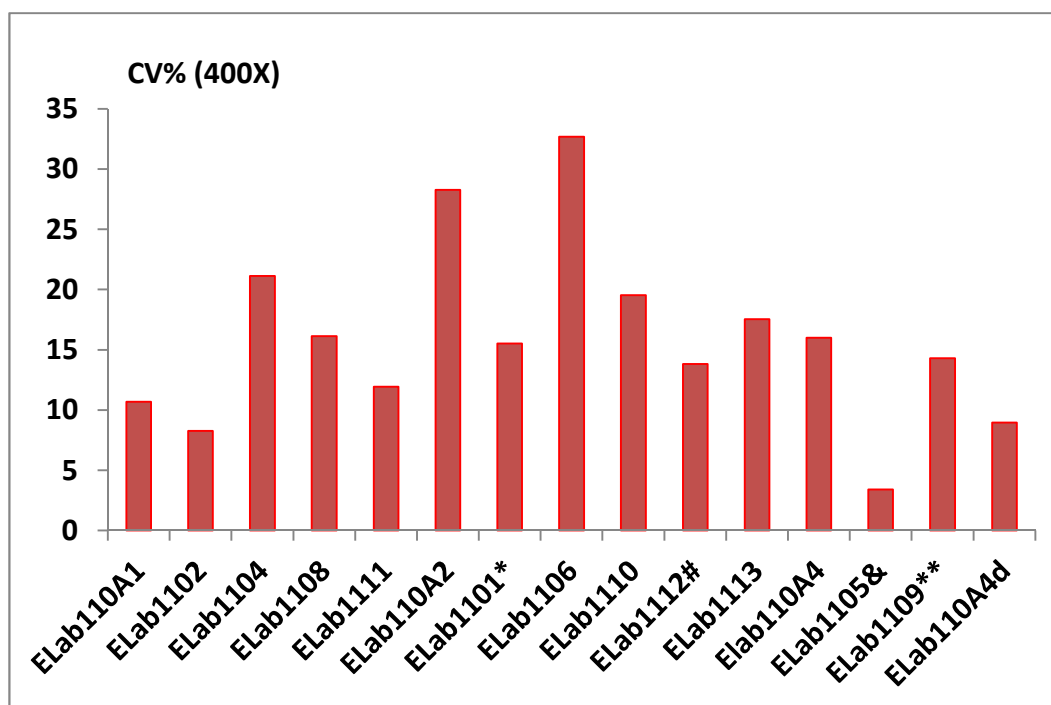


Fig. 17 - Coeficiente de variação (%) referente a cada um dos participantes na contagem de Nano fitoplâncton (nº de unidades taxonómicas) na ampliação 400X.

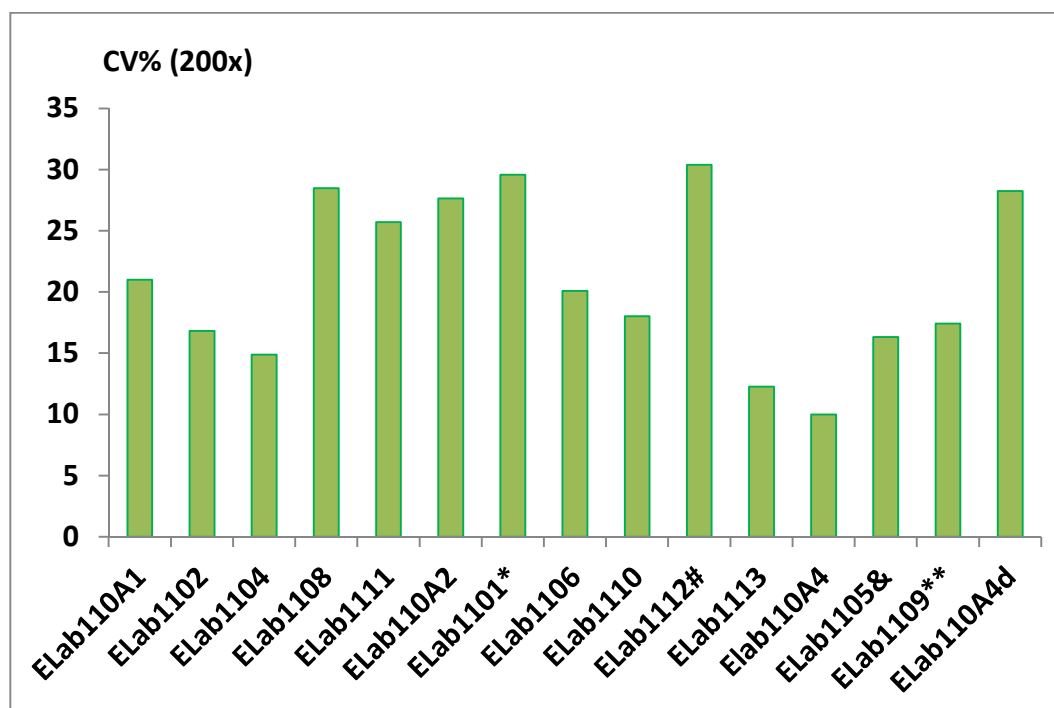


Fig. 18 - Coeficiente de variação (%) referente a cada um dos participantes na contagem de Micro fitoplâncton (unidades taxonómicas) na ampliação 200X.

5 - CONCLUSÕES

A - Os resultados referentes à **análise quantitativa do Fitoplâncton** obtidos pelos participantes, durante o exercício realizado em Abril /Maio de 2011, no Laboratório de Referência do Ambiente (LRA), traduzem **um bom desempenho**. O conjunto da informação obtido (I) coeficiente de variação de **28%** (n=15) entre os resultados dos participantes, (II) distribuição normal dos resultados, (III) resultados dos *Boxplots* e (IV) Carta de Controlo, traduzem uma variabilidade relativamente baixa.

B – Na análise do fitoplâncton os **erros estatísticos inerentes à contagem** condicionam a área na qual o verdadeiro valor reside com um grau de probabilidade de 95%.

Considerando os resultados obtidos pelos participantes com ampliação 200X (Micro fitoplâncton), verificou-se que o nº médio de unidades taxonómicas contadas se traduziu num erro de $\pm 19\%$. O número médio de unidades de contagem de por ex. *C. reticulatum* $>20 \mu\text{m}$ foi de 60 o que é indicativo de que nesta ampliação para este *taxon* a contagem de seis transeptos, pode ser considerada suficiente.

Na ampliação de 400X (Nano fitoplâncton) o número médio de unidades taxonómicas contadas traduziu-se por um erro de $\pm 5\%$. As contagens referentes à unidade taxonómica *Merismopedia* spp. (4 cel/*coenobium*) apresentaram o nº médio de 1 207. Todos os participantes, incluindo os que contaram dois e três transeptos, registaram valores de L.C. 95% inferiores a 20%. Conclui-se pois, que para esta unidade taxonómica, teriam sido suficientes, para uma contagem estatisticamente significativa, dois a três transeptos. Contudo para o *taxon C. reticulatum* $<20 \mu\text{m}$ os participantes que contaram dois e três transeptos registaram valores demasiado elevados de L.C. 95%, sendo de salientar que para este *taxon* é necessário a contagem de seis transeptos para se obterem valores estatisticamente significativos.

C - Para definir a **estratégia de contagem** há que ter presente quais os *taxa* mais importantes na amostra a analisar em termos de abundância e antever a sua importância em termos de biovolume.

Face aos resultados obtidos pode-se concluir que a estratégia mais adequada para se obter uma contagem estatisticamente significativa em termos de **esforço de contagem vs precisão** deveria ser a seguinte:

- Usar a **ampliação de 200X** para os *taxa* do Micro fitoplâncton incluindo, *C. reticulatum* >20 µm, e fazer a contagem de seis transeptos a meia câmara.
- Usar a **ampliação de 400X** para os *taxa* do Nano fitoplâncton. Fazer contudo, a contagem de dois a três transeptos para o *taxon Merismopedia* spp., e seis transeptos para os outros *taxa*, nomeadamente *C. reticulatum* <20 µm.

Procedimentos a adoptar no futuro

1 - Volume de sedimentação

Recomenda-se o uso simultâneo de 3 câmaras de sedimentação de diferentes volumes (ex. 25, 10 e 5 ml) de modo a que na câmara escolhida seja possível contar aproximadamente 50 unidades de contagem/indivíduos das espécies mais comuns, quando usados 1 a 6 transeptos numa ampliação alta (e.g. 400X) e se necessário todo o fundo da câmara de sedimentação na ampliação baixa (e.g. 200X).

O número de 50 indivíduos deve referir-se sempre às unidades de contagem do *taxon* significando, para as formas filamentosas 50 filamentos e para as formas coloniais 50 colónias, etc.. Os números das células individuais das colónias/*coenobia* devem ser calculados separadamente assim como o número de células dos filamentos.

2 - Contagem

Os resultados obtidos revelam que o aumento da precisão de uma análise de fitoplâncton requer a optimização de uma estratégia de contagem combinada.

Células de grandes dimensões (ex. *Ceratium* spp.), colónias (ex. *Fragilaria* spp., *Microcystis* spp., *Tabellaria* spp.), *coenobia* (ex. *Coelastrum* spp., *Pediastrum* spp., *Woronichinia* spp.) e filamentos (ex. *Anabaena* spp., *Aphanizomenon* spp., *Tribonema* spp.) devem ser contados **como uma unidade taxonómica** numa ampliação baixa (ex. 200X) em toda a câmara, metade da câmara ou em 6 transeptos, dependendo da abundância da amostra.

Caso seja realizada a contagem em meia câmara, esta deve ser feita tomando em conta sempre o 2º transecto de modo a obter-se uma contagem distribuída por toda área do fundo da câmara e não a área correspondente à metade superior ou inferior da câmara.

Células de pequenas dimensões (ex. células isoladas de *Microcystis* spp., *Chroomonas* spp., *Plagioselmis* spp., *Tetraedron* spp.), *coenobia*/colónias de pequenas dimensões

(ex. *Merismopedia* spp., *Crucigenia* spp.) devem ser contadas em ampliação elevada (ex. 400X) recorrendo ao **nº de campos /transeptos** considerados necessários, dependendo da abundância.

Estimativas de incerteza relativa devem ser obtidas a partir de contagens de fitoplâncton realizadas por vários analistas. A incerteza quantitativa depende em certa medida da abundância de um *taxon* específico numa amostra e em parte da quantidade de unidades contadas (Lund *et al.*, 1958; Olrik *et al.*, 1998).

6 - REFERÊNCIAS

- Andersen, P & J. Throndsen, 2003. Estimating cell numbers. In Hallegraeff, G.M. Anderson D.M. & A.D. Cembella (eds) *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Monogr. on Oceanogr. Method. no. 11. p.99-130. UNESCO Publishing, Paris.
- Brierley, B. Carvalho, L. Davies, S. & J. Krokowski, 2007. Guidance on the quantitative analysis of phytoplankton in Freshwater samples. *Phytoplankton Counting Guidance v1 2007 12 05.doc* .
- NE 15204, 2006 - *Water quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)*.
- Hallegraeff, G.M., Andersen D.M. & A.D. Cembella (eds), 2003. *Manual on Harmful Marine Microalgae*. UNESCO Publishing, Paris, 793 pp.
- HELCOM, 2003. Manual for Marine Monitoring in the COMBINE Programme of HELCOM, ANNEX C-6: Phytoplankton Species composition, Abundance and Biomass, 12 pp.
- INAG, 2009. *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*. Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional Instituto da Água, I.P.
- Lund, J. W. G., Kipling, C. & E. D. Le Cren, 1958. The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia* 11: 2, pp. 143-170.
- Olrik, K., Blomqvist P., Cronenberg G. & P. Eloranta, 1998. *Methods for quantitative assessment of phytoplankton in freshwaters, part I*. Swedish Environmental Protection Agency, Report 4860, 85 pp.
- Rott, E., Salmaso, N. & E. Hoehn, 2007. Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates - an easy task or a Gordian knot?. *Hydrobiologia*, 578:141-146.
- Venrick, E.L., 1978. How many cells to count?. – In Sournia, A. (ed.). *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology* 6 UNESCO, Paris, pp. 167-180.

ANEXO

Calibração das câmaras de sedimentação

O volume das câmaras de sedimentação deve ser determinado com rigor, uma vez que o volume nelas indicado é meramente indicativo. Assim, para medir o volume da câmara de sedimentação, pesar a câmara vazia e respectiva cobertura. Em seguida preencher com água de osmose inversa (ou água de qualidade equivalente) colocar a cobertura e voltar a pesar. O peso em gramas é equivalente ao volume em mililitro. Repetir de 3 a 6 vezes e registar a média dos resultados.

Exemplo:

Balança Mettler Toledo AG 204

Max. 2,10 g

Câmara de sedimentação A

Volume indicativo=2,5 ml

Pesagens	Câmara vazia+tampa, P1 (g)	Câmara+água de osmose inversa+tampa, P2 (g)	P2-P1 (g)
n=1	19,2626	21,6624	2,3998
	19,2626	21,6623	2,3997
	19,2626	21,6622	2,3996
	19,2626	21,6622	2,3996
	19,2626	21,6622	2,3996
			2,40
			CV%=0,004

O peso em gramas é equivalente ao volume em mililitros

Volume da câmara A = 2,4 ml