

Ensaio Laboratorial de Fitoplâncton – 2011

Discussão de resultados, identificação e determinação de biovolume - formas complexas



Staurastrum sp.

Laboratório de Referência do Ambiente, LRA

No âmbito do projecto de colaboração INAG, APA e CIIMAR



Ceratium hirundinella



AGÊNCIA PORTUGUESA DO AMBIENTE

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO MAR, DO AMBIENTE E DO ORDENAMENTO DO TERRITÓRIO

RELATÓRIO

DEZEMBRO 2011

LEONOR CABEÇADAS

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FOTOGRAFIAS

1 - INTRODUÇÃO	5
2 - OBJECTIVOS	5
3 - RESULTADOS	6
3.1-Determinação dos biovolumes de fitoplâncton de formas complexas	6
3.2-Identificação de espécies de fitoplâncton	13
3.2.1-Amostra B – ALBUFEIRA DO ALVITO, Junho de 2011	13
3.2.2- Amostra C – ALBUFEIRA DO CALDEIRÃO, Maio de 2011	17
3.3-Discussão dos resultados obtidos no exercício de comparação interlaboratorial	20
3.3.1-Fundamento teórico	20
3.3.2-Contagem vs precisão	20
4 - CONCLUSÕES	21
5 - REFERÊNCIAS	25

ANEXO I- LISTA DAS ESPÉCIES DE FITOPLÂNCTON NAS AMOSTRAS DAS ALBUFEIRAS DO ALVITO E DO CALDEIRÃO

ANEXO II – REFERÊNCIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE FITOPLÂNCTON DE ÁGUA DOCE

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Biovolume de *Ceratium hirundinella*.

Tabela 2 – Biovolume de *Staurastrum pseudosebaldi*.

Tabela 3 - Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança (L.C.) (para um nível de confiança de 95%). Caso teórico.

Tabela 4 – Resultados obtidos na análise quantitativa de fitoplâncton (cel/ml) para a amostra B – Alvito, Junho de 2011 (n = nº de participantes, SD = Desvio Padrão e CV% = Coeficiente de Variação em percentagem).

Tabela 5 - Resultados obtidos na análise quantitativa de Fitoplâncton (cel/ml) para a amostra C – Caldeirão, Maio de 2011 (n = nº de participantes, SD = Desvio Padrão e CV% = Coeficiente de Variação em percentagem).

Tabela 6 – Resultados de Biovolume (mm^3/l) para as cinco espécies mais abundantes na amostra B – Alvito, Junho de 2011 (n = nº de participantes, SD = Desvio Padrão e CV% = Coeficiente de Variação em percentagem).

LISTA DE FIGURAS

- Fig.1** – Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança (L.C.) (para um nível de confiança de 95%). Caso teórico.
- Fig.2** - Relação entre o nº de células contadas pelos participantes e o limite de confiança (L.C.) (para um nível de confiança de 95%).
Amostra B – Alvito, Junho de 2011.
- Fig.3** – Resultados da análise quantitativa de fitoplâncton (cel/ml).
Amostra B – Alvito, Junho de 2011.
- Fig.4** - Relação entre o nº de células contadas pelos participantes e o limite de confiança (L.C.) (para um nível de confiança de 95%).
Amostra C – Caldeirão, Junho de 2011.
- Fig.5** - Resultados da análise quantitativa de fitoplâncton (cel/ml).
Amostra C – Caldeirão, Maio de 2011.
- Fig.6** – Resultados de Biovolume (mm^3/l) para as cinco espécies de fitoplâncton mais abundantes na Amostra B – Alvito, Junho de 2011.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fot. 1 – Exemplificação das medições necessárias para aplicação da equação CEN, 2007 à forma complexa de *Ceratium hirundinella*.

Fot. 2 – Exemplificação das medições necessárias para aplicação da equação CEN, 2007 à forma complexa de *Ceratium furcoides*.

Fot. 3 - Exemplificação das medições necessárias para aplicação da equação CEN, 2007 à forma complexa de *Staurastrum* sp..

Fot. 4 – *Staurastrum pseudosebaldi*.

Fot. 5 – *Merismopedia warmingiana* e *M. tenuíssima*.

Fot. 6 – *Woronichinia delicatula*.

Fot. 7 – *Chroomonas acuta* e *Plagioselmis nannoplanctica*.

Fot. 8 – *Mallomonas akrokomos* e *M. akrokomos* var. *parvula*.

Fot. 9 – *Tabellaria fenestrata* e *Fragilaria crotonensis*.

Fot. 10 – *Paulschulzia pseudovolvox*.

Fot. 11 – *Volvox aureus* e *Eudorina elegans*.

Fotografias: Leonor Cabeçadas

Ensaio Laboratorial de Fitoplâncton – 2011

Discussão de resultados, identificação e determinação do biovolume - formas complexas

1 - INTRODUÇÃO

A Directiva 2000/60/CE é uma Directiva Comunitária (DQA) que visa estabelecer um quadro comum para a protecção das águas interiores de superfície e subterrâneas, das águas de transição e das águas costeiras, da União Europeia. Esta Directiva foi transposta para a ordem jurídica nacional através da Lei nº58/2005 de 29 de Dezembro e do Decreto-Lei nº77/2006 de 30 de Março.

O descritor Biológico de qualidade **Fitoplâncton** é um dos componentes chave no Sistema de Classificação da Qualidade Ecológica das massas de água que está a ser aplicado nos Estados Membros.

A implementação da DQA exige uma maior uniformização dos métodos analíticos e, especificamente no caso de análises de Fitoplâncton (contagem e identificação), dos métodos de contagem fiáveis tendo em vista a estimativa da respectiva biomassa. A identificação das espécies exige experiência, acesso a literatura especializada, trabalhos de âmbito nacional e revisões taxonómicas actualizadas.

2 - OBJECTIVOS

Com o objectivo de harmonizar metodologias de contagem, de identificação e de determinação da biomassa de Fitoplâncton, e na sequência de exercícios realizados anteriormente, foi organizado o 4º exercício interlaboratorial em 2011 coordenado pelo INAG, APA e CIIMAR-Universidade do Porto. No exercício participaram 17 analistas de 11 Instituições Nacionais.

No âmbito do exercício foram analisadas pelos participantes 2 amostras naturais de albufeiras de Portugal no período de verão (Maio/Junho de 2011) correspondendo a águas de diferentes zonas geográficas:

1-Amostra B - Barragem do Alvito (Alentejo)

2-Amostra C - Barragem do Caldeirão (Mondego)

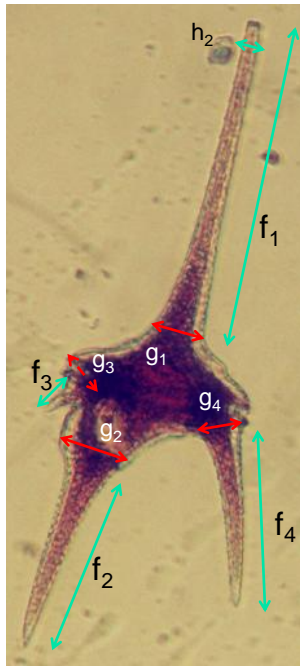
Para a amostra B foi ainda proposto que se realizasse a estimativa do biovolume para as cinco espécies mais abundantes da amostra.

3 - RESULTADOS

3.1 – DETERMINAÇÃO DO BIOVOLUME DE FITOPLÂNCTON

(FORMAS COMPLEXAS)

- Em termos de caracterização ecológica das massas de água superficiais, torna-se necessário proceder-se a **medições morfométricas** de fitoplâncton expressas em **biovolume** visto apresentarem vantagens em relação aos clássicos descritores taxonómicos em termos da sua classificação.
- Apresentam-se 3 exemplos de estimativas de biovolume referentes a formas complexas de fitoplâncton tais como as pertencentes aos géneros *Ceratium* e *Staurastrum*, utilizando as equações indicadas no documento de trabalho CEN/TC230/WG2/TG3/ N108, 2007.
- As referidas equações normalizam a estimativa do biovolume do fitoplâncton quando comparado com estimativas baseadas na escolha mais ou menos livre de sólidos geométricos associados à forma central do corpo da espécie, que no caso do género *Ceratium* pode ser esfera, elipsoide, trapezóide e no caso de *Staurastrum*, 2 cones truncados, tetraedro, sendo os cornos/espinhos em ambos os géneros associados a formas geométricas tais como cilindros, cones, etc.
- As espécies estudadas, *Ceratium hirundinella*, *Ceratium furcoides* e *Staurastrum pseudosebaldii* foram amostradas na Albufeira do Alvito em várias ocasiões no decorrer do Projecto.

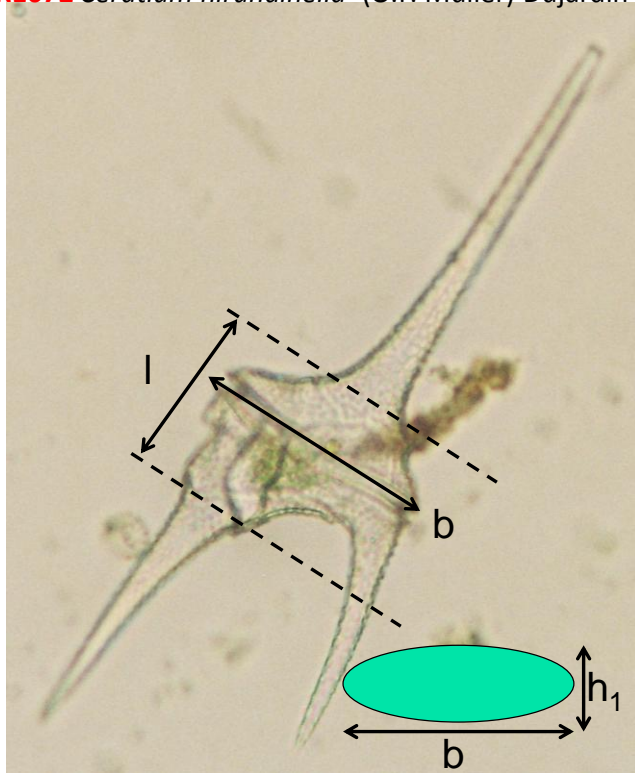


f₁ = corno apical
 f₂ = corno antapical
 f₃ = corno antapical
 f₄ = corno antapical

h₂ = diâmetro corno apical

g₁ = diâmetro base corno apical
 g₂ = diâmetro base corno antapical
 g₃ = diâmetro base corno antapical
 g₄ = diâmetro base corno antapical

R1672 *Ceratium hirundinella* (O.F. Müller) Dujardin 1841



l = altura do corpo
 b = largura do corpo
 h₁ = espessura
 (calculada como 1/3 de b)

V=41 450 μm³; n=8 células
 (média das dimensões)

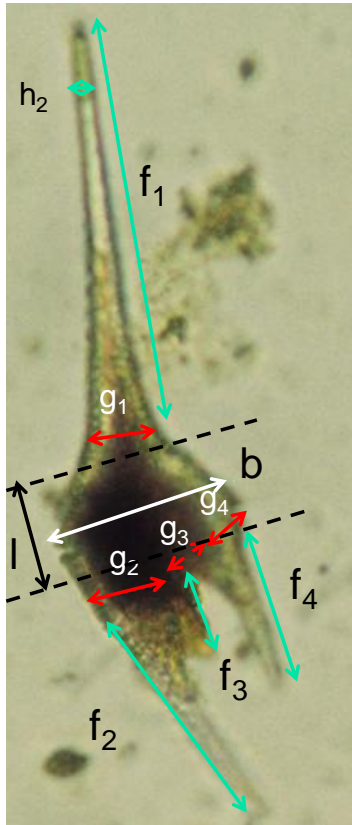
V=39 856 μm³ ; n=8 células (mediana)

$$V = (\pi/12 * f_1 * (h_2^2 + h_2 * g_1 + g_1^2)) + (\pi/6 * l * b * h_1) + \pi/12 * (g_2^2 * f_2 + g_3^2 * f_3 + g_4^2 * f_4)$$

Fot. 1 – Exemplificação das medições necessárias para aplicação da equação CEN, 2007 à forma complexa de *Ceratium hirundinella*.

Tabela 1 - Biovolume de *Ceratium hirundinella*; 12 parâmetros; n=8 células; CEN, 2007

nº Cel. n=8	Larg. (l, µm)	Corno Apical (h, µm)	Base Corno Apical (d, µm)	Corno Anta pical (h, µm)	Base Corno Anta pical (d, µm)	Corno Anta pical (h, µm)	Base Corno Anta pical (d, µm)	Corno Anta pical (h, µm)	Base Corno Anta pical (d, µm)	Corno Apical (d, µm)	Espessura do corpo (w, µm)	Altura do corpo (h, µm)	Biovolume (µm³)
	b	f₁	g₁	f₂	g₂	f₃	g₃	f₄	g₄	h₂	h₁	l	B
1	72,0	126,0	14,4	79,2	21,6	72	14,4	54	10,8	3,6	24,0	32,4	53 156
2	63,6	99,6	10,2	71,3	9,0	73,2	9,0	30,6	5,0	3,6	26,8	36,6	39 662
3	61,2	108,0	10,8	90	9,0	90,0	9,0	32,4	5,0	3,6	20,4	32,4	29 767
4	57,6	79,2	7,2	62,1	9,0	72,0	9,0	28,8	5,0	3,6	19,1	43,2	29 593
5	72,0	108,0	10,8	72,0	9,0	61,3	9,0	25,2	5,0	3,6	24,0	36,0	40 050
6	64,8	97,2	10,8	72,0	9,0	61,2	9,0	25,2	5,0	3,6	21,6	36,0	33 429
7	72,0	126,0	18,0	54,0	18,0	72,0	14,4	43,2	7,2	9,0	24,0	28,8	53 466
8	90,0	118,8	18,0	72,0	10,5	30,0	14,4	36	7,2	10,8	30,0	30,0	66 021
Mediana	68,4	108,0	10,8	72,0	9,0	72,0	9,0	31,5	5,0	3,6	24,0	34,2	39 856
Média	69,2	107,9	12,5	71,6	11,9	66,5	11,0	34,4	6,3	5,2	23,7	34,4	41 386
CV%	12,8	13,0	27,8	13,1	37,7	23,0	23,1	25,5	29,9	51,3	13,0	11,7	28,1



f_1 = corno apical, 89,4 μm
 f_2 = corno antapical, 71,9 μm
 f_3 = corno antapical, 32,2 μm
 f_4 = corno antapical, 35,5 μm

h_2 = diâmetro corno apical, 3,5 μm

g_1 = diâmetro base corno apical, 14,1 μm
 g_2 = diâmetro base corno antapical, 10,8 μm
 g_3 = diâmetro base corno antapical, 14,0 μm
 g_4 = diâmetro base corno antapical, 10,5 μm

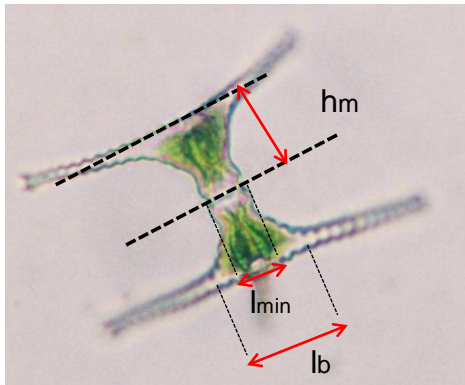
l = altura do corpo, 32,7 μm
 b = largura do corpo, 42,8 μm
 h_1 = espessura, 14,3 μm
 (calculada como 1/3 de b)

$V=25\ 743\ \mu\text{m}^3$; $n=8$ células (média das dimensões)
 $V=26\ 016\ \mu\text{m}^3$; $n=8$ células (mediana)

R1671 *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans 1925

$$V = (\pi/12 * f_1 * (h_2^2 + h_2 * g_1 + g_1^2)) + (\pi/6 * l * b * h_1) + \pi/12 * (g_2^2 * f_2 + g_3^2 * f_3 + g_4^2 * f_4)$$

Fot. 2 – Exemplificação das medições necessárias para aplicação da equação CEN, 2007 à forma complexa de *Ceratium furcoides*.



RXXXX *Staurastrum pseudosebaldi* Wille

hm = altura, μm
 lmin = largura do istmo, μm
 lb = largura máxima sem processos, μm
 ds = diâmetro espinho, μm
 lst = comprimento do processo, μm

$V=19\,587\ \mu\text{m}^3$; n=17 células
 (média das dimensões)
 $V=17\,479\ \mu\text{m}^3$; n=17 células (mediana)

$$V = \frac{2}{3} \cdot h_m \cdot \left(\sqrt{\frac{3}{4} \cdot (l_{\min}^2 + l_b^2)} + \sqrt{\frac{3}{16} \cdot l_{\min}^2 \cdot l_b^2} \right) + \frac{\pi}{2} \cdot d_s^2 \cdot l_{st}$$

Fot. 3 - Exemplificação das medições necessárias para aplicação da equação CEN, 2007 à forma complexa de *Staurastrum* sp.

Tabela 2 - Biovolume de *Staurastrum pseudosebaldi*; 5 parâmetros; n = 17 células; CEN, 2007

Nº Cél. n=15	Altura hm, µm	Larg. Istmo lmin, µm	Lar. máx. sem espinhos lb, µm	Diâmetro do espinho ds, µm	Comp. do espinho lst, µm	Biovolume µm³
1	14,4	12,6	21,6	5,4	45,0	26 246
2	18,0	12,6	27,0	3,6	32,4	19 011
3	16,2	9,0	21,6	3,6	28,8	12 427
4	18,0	12,6	27,0	5,4	28,8	26 961
5	16,2	9,0	18,0	3,6	36,0	12 524
6	14,4	9,0	25,2	3,6	41,4	15 064
7	14,4	12,6	21,6	3,6	28,8	12 023
8	14,4	10,8	18,0	3,6	32,4	10 860
9	18,0	14,4	23,9	5,4	43,2	33 792
10	18,0	12,6	27,0	3,6	36,0	19 894
11	18,0	9,0	21,6	3,6	27,0	13 366
12	18,0	9,0	18,0	5,4	39,1	26 669
13	18,0	10,8	19,8	3,6	45,0	17 479
14	18,0	12,6	21,6	3,6	36,0	16 795
15	16,2	12,6	21,6	3,6	39,1	15 801
16	21,6	12,6	21,6	5,4	36,0	33 405
17	23,4	12,6	19,8	3,6	36,0	20 667
Mediana	18,0	12,6	21,6	3,6	36,0	17 479
Média	17,4	11,4	22,1	4,1	35,9	19 587
CV%	13,4	15,0	13,0	26,3	15,0	35,0

Apresentam-se 3 exemplos de estimativas de biovolume de formas complexas de fitoplâncton, nomeadamente as pertencentes aos géneros *Ceratium* e *Staurastrum*, empregando as equações indicadas no documento CEN/TC230/WG2/TG3/ N108, 2007 – *Water Quality – Draft proposal – Phytoplankton biovolume determination using inverted microscopy (Utermöhl technique)*.

- A utilização das equações referidas permite normalizar a estimativa do biovolume quando comparado com estimativas baseadas na escolha mais ou menos livre de sólidos geométricos associados à forma central do corpo da espécie e dos processos.
- As equações referidas corrigem a forte compressão dorso-ventral que caracteriza as células pertencentes às espécies referidas.

- Na amostra da Albufeira do Alvito - Amostra B obtida em Junho de 2011 as 3 espécies mais importantes em termos de biovolume foram: *Ceratium hirundinella*, *Ceratium furcoides* e *Staurastrum pseudosebaldi*.

- Os biovolumes foram calculados de acordo com o que está exemplificado nas Tabelas 1 e 2 :
 - 1 - a partir da **mediana** de uma determinada série de biovolumes individuais de células de uma mesma espécie (segundo o documento de trabalho CEN, 2007).
 - 2 - a partir da **média** das medições efectuadas num determinado número de células da mesma espécie.

3.2 - IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO FITOPLÂNCTON

Apresentam-se os resultados referentes à identificação do fitoplâncton nas amostras naturais, nomeadamente da **Amostra B – Barragem do Alvito** e da **Amostra C- Barragem do Caldeirão/Mondego**, respectivamente em Junho e Maio de 2011.

3.2.1 - Amostra B – Albufeira do Alvito – Junho de 2011

Composição específica

Foram identificadas 104 unidades taxonómicas de fitoplâncton, pertencentes às Chlorophyceae (47), Conjugatophyceae (8), Cyanobacteria (16), Bacillariophyceae (10), Cryptophyceae (7), Euglenophyceae (7), Klebsormidiophyceae (2), Dinophyceae (3), Chrysophyceae (4) e diversos fitoflagelados.

Espécies mais importantes em termos de biovolume:

Ceratium hirundinella

Ceratium furcoides

Staurastrum pseudosebaldi

Espécies mais importantes em termos de abundância:

Merismopedia tenuissima,

Merismopedia warmingiana (Sin: *Merismopedia minima* ?)

Chroomonas acuta, *Plagioselmis nannoplanctica*

Coelastrum reticulatum

Sphaerocystis Schroeteri

Ankyra judayi

Mallomonas akrokomos

Conjugatophyceae/ Desmidiáles



RXXXX *Staurastrum pseudosebaldi* Wille

Larg. do istmo: 9-12,6; 11,4 μm
Larg. da célula sem os espinhos: 18-25,2 μm ; 22,1 μm
Larg. da célula com os espinhos: 75,6-111,2 μm ; 93,9 μm
Comp./Altura (h) da célula :28,8-46,8 μm ; 33,1 μm
Comp. dos espinhos = 27-45 μm ; 35,9 μm

2 séries de grânulos acima do istmo, margem superior recta ou suavemente convexa, ângulos prologados em espinhos longos, levemente curvos, convergentes, margens crenuladas, extremidade 3-4-denticulada. Vista apical da célula 3-radiada, margens verrucosas, 1 série de espinhos intramarginais.



R1304 *Staurastrum planctonicum* Teiling 1946

Larg. do istmo: 9 – 13 μm ; 12,5 μm
Larg. da célula sem os espinhos = 20 - 67 μm ; 25 μm
Larg. da célula com os espinhos = 70- 117 μm ; 75 μm
Comp./Altura da célula (h)= 50-65 μm ; 43,8 μm
Comp. dos espinhos = 25 μm ; 25 μm

**EQAT – External Quality Assessment Trials
Phytoplankton**

<http://www.planktonforum.eu/>

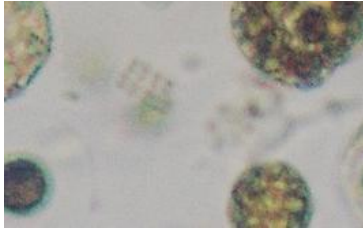


2 séries de grânulos acima do istmo

RXXXX *Staurastrum pseudosebaldi* Wille

Fot. 4 - *Staurastrum pseudosebaldi*

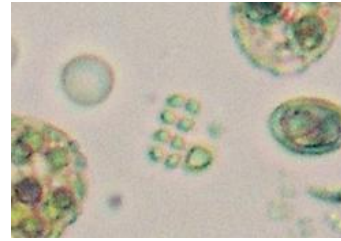
Cyanophyceae/ Chroococcales



R1481 *Merismopedia warmingiana*
Lagerheim 1883
(Sin. **R1476** *M. minima* Beck 1897)

Célula: 0,5 – 1(-1,2) μm

Colónia regular, plana, com células mais ou menos densamente agrupadas 4-16(-64), por vezes agrupadas em tetraedros e composta por subcolónias de fácil desintegração. Mucilagem difluente, normalmente larga rodeando as células. Células esféricas 0,5-1(-1,2) μm .



R1479 *Merismopedia tenuissima*
Lemmermann 1898

Célula: 0,4 – 1,6 μm

Colónia normalmente plana e rectangular, frequentemente agregada em grupos de colónias, cada uma tipicamente com 16 células, por vezes mais. Células normalmente muito perto umas das outras, esféricas, elipsoidais ou (após divisão recente) hemisféricas, 0,4 – 1,6 μm .

Fot. 5 – *Merismopedia warmingiana* e *M. tenuissima*

Cyanophyceae/ Chroococcales

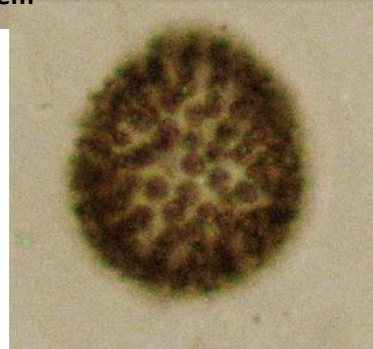
Salienta-se que estas colónias depois de a amostra ser fixada com Lugol desaparecem



Colónia em 2 planos de focagem

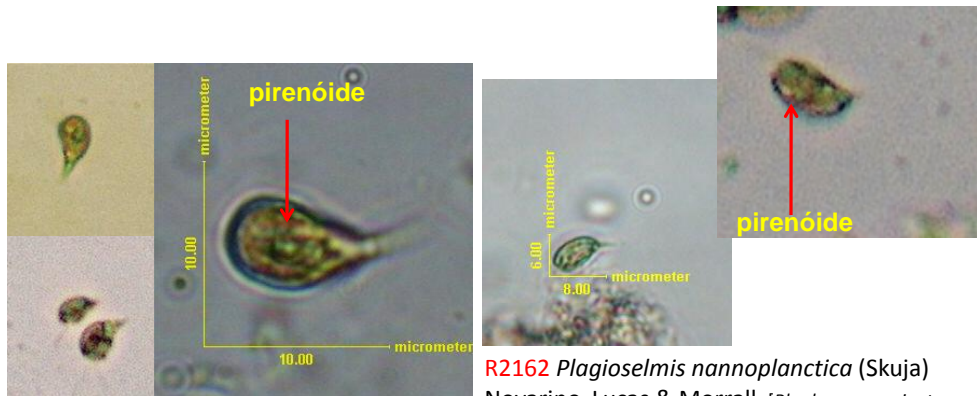
R1522 *Woronichinia delicatula* (Skuja)
Komárek et Hindák 1988 *In vivo*

Colónia: d=72 μm ; 63 μm
Célula: d=0,9 μm ; 0,4 μm



FOT. 6 – *Woronichinia delicatula*

Chryptophyceae/Cryptomonadales



R1368 *Chroomonas acuta* Utermöhl
Célula: 7-10 x 4,5-5,5 µm

Células obovadas em vista lateral, pólo posterior afilado, voltado para a região ventral; 1 cloroplasto lobado, 1 pirenóide dorsal mediano fora do cromatóforo cercado de grânulos de amido. Flagelos de diferente comprimento não inseridos na citofaringe.

R2162 *Plagioselmis nannoplanctica* (Skuja)
Novarino, Lucas & Morrall [*Rhodomonas minuta* var. *nannoplanctica* Skuja]
Célula: 7,5-11 x 3,5-6 µm

Células sub ovóides, curvadas e piriformes em vista lateral, em vista frontal e dorsal apresentam-se piriformes, mas não curvadas lateralmente. Pólo anterior obliquamente truncado. Pólo posterior curvado e fortemente ponteagudo. Um único cromatóforo laminado. Um pirenóide, proeminente, no lado dorso-ventral. Flagelos de diferente comprimento não inseridos na citofaringe.

Fig.7 – *Chroomonas acuta* e *Plagioselmis nannoplanctica*

Chrysophyceae/Synurales



R1097 *Mallomonas akrokomos* Ruttner in Pascher 1913

5,4 - 7,2 µm x 25,2 – 36 µm

Célula em forma de agulha, esguia e longa, envolvida por envelope de sílica, alargada junto ao ápice, cauda ponteaguda; sedas presentes formando um agrupamento apical ; um flagelo cerca de metade do comprimento do corpo; 2 cloroplastos parietais.

R1098 *Mallomonas akrokomos* var. *parvula* Conrad 1927
2 – 3 µm x 8 – 12 µm
Consideravelmente mais pequena que a anterior e com 4 ou menos sedas

Fot. 8 – *Mallomonas akrokomos* e *M.akrokomos* var.*parvula*

3.2.2 - Amostra C – Albufeira do Caldeirão/Mondego, Maio de 2011

Composição específica

Foram identificadas 42 unidades taxonómicas de fitoplâncton pertencentes aos grupos diversos Chlorophyceae (22), Cryptophyceae (4), Bacillariophyceae (9), Chrysophyceae (2), Euglenophyceae (1) e diversos fitoflagelados.

Espécies mais importantes em termos de abundância:

Tabellaria fenestrata

Fragilaria crotonensis

Anabaena catenula var. *affinis*

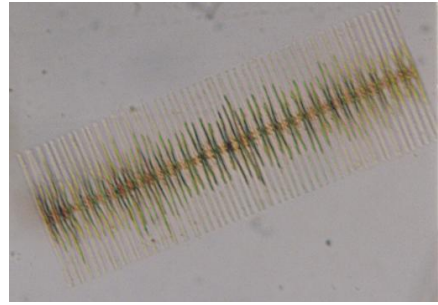
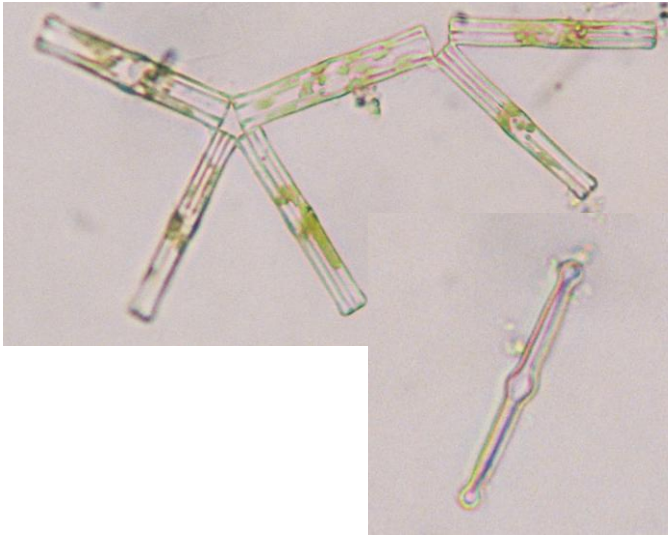
Outras espécies presentes:

Eudorina elegans

Paulschulzia pseudovolvox

Volvox aureus

Baccillariophyceae/Pennales

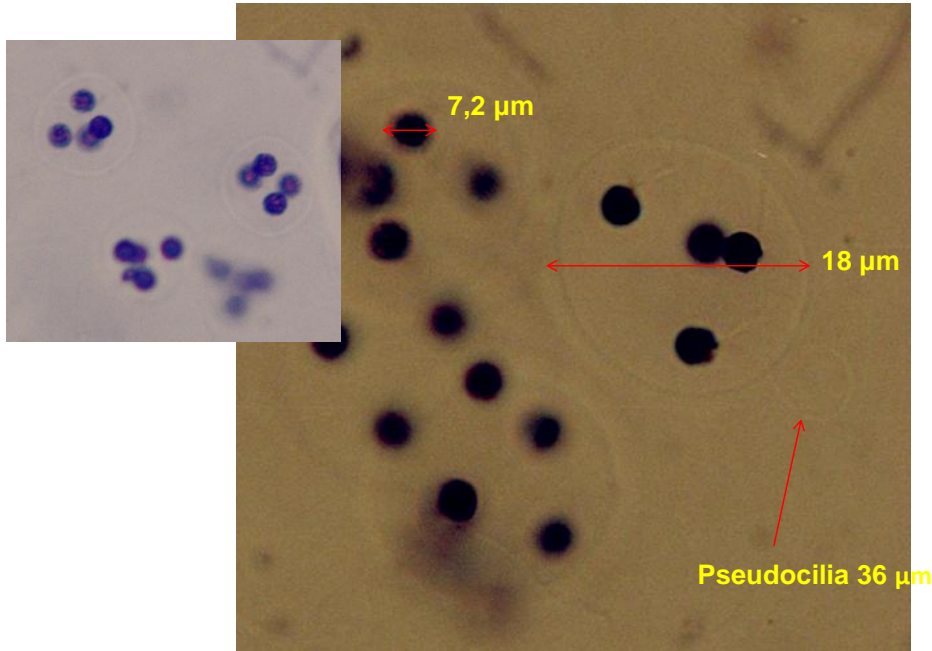


R0223 *Fragilaria crotonensis*
Kitton 1869

R0440 *Tabellaria fenestrata* (Lyngbye) Kützing 1844

Fot.9 – *Tabellaria fenestrata* e *Fragilaria crotonensis*

Chlorophyceae/Tetrasporales



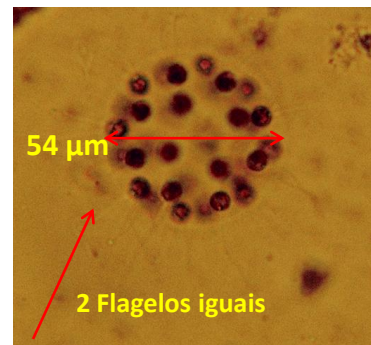
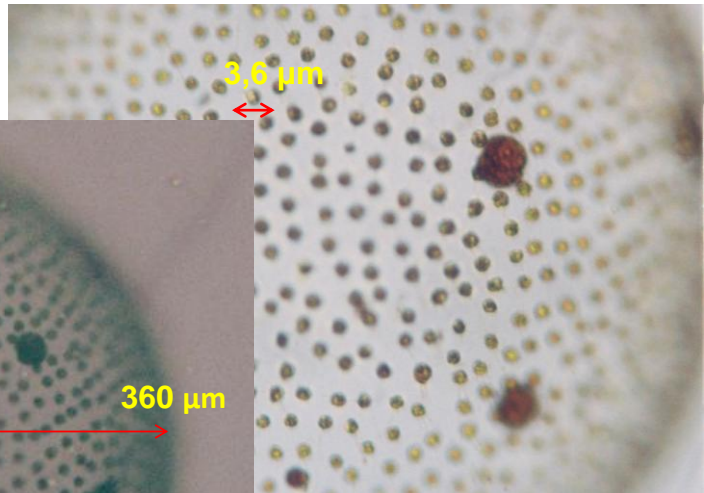
R0906 *Paulschulzia pseudovolvox* (Schulz) Skuja 1948

Fot.10 – *Paulschulzia pseudovolvox*

Chlorophyceae/Volvocales



R0998 *Volvox aureus* Ehrenberg 1832



R0963 *Eudorina elegans*
Ehrenberg 1832

Fot. 11 – *Vovox aureus* e *Eudorina elegans*

3.3 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO EXERCÍCIO DE COMPARAÇÃO INTERLABORATORIAL (ECI)

3.3.1 - Fundamento teórico

Para uma contagem de fitoplâncton estatisticamente aceitável, recomenda-se serem contadas pelo menos 50 unidades de cada um dos *taxon* dominantes (células, colónias ou filamentos). A contagem total deve atingir os 500 indivíduos (Venrick, 1978).

Tabela 3 - Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança (L.C.), (para um nível de confiança de 95%) (Anderson & Thröndsen 2003).

Nº de células contadas	L.C. ± (%)
1	200
2	141
3	116
4	100
5	89
6	82
7	76
8	71
9	67
10	63
15	52
20	45
25	40
40	32
50	28
75	23
100	20
200	14
400	10
500	9
700	8
1000	6
2000	5
5000	3

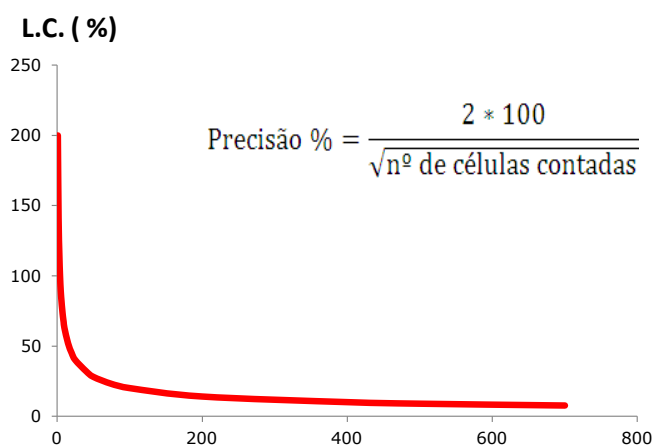


Fig.1 - Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança (L.C.), (para um nível de confiança de 95%).

3.3.2 - Contagem vs precisão

É de salientar que um esforço de contagem acima de um certo patamar (por ex. 500 células, *coenobia*/colónias e filamentos) não se traduz necessariamente num aumento significativo de precisão (Fig.1).

Na Fig.2 podem ser observados o resultados do esforço de contagem vs precisão referentes aos participantes no Exercício Comparação Interlaboratorial (ECI) de 2011 para a **amostra B - Alvito**. Todos os participantes efectuaram um esforço de contagem acima do patamar exigido para uma contagem estatisticamente significativa.

Os resultados referentes à análise quantitativa de fitoplâncton obtidos pelos participantes variaram entre 1 947 cel/ml (Lab1112) e 13 654 cel/ml (Lab1118) com valores de média e desvio padrão (SD) respectivamente de 6 132 e 3 653 cel/ml (Tabela 4). Os resultados da análise de fitoplâncton da amostra B – Alvito encontram-se representados na Fig.3.

Fitoplâncton - Amostra B – Alvito, Junho 2011

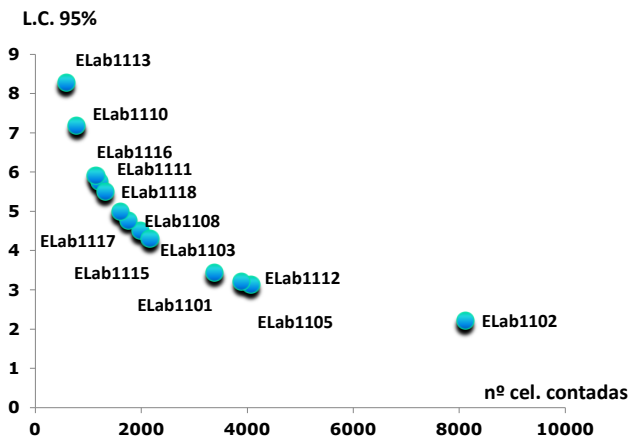


Fig.2 – Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

Fitoplâncton – Amostra B – Alvito, Junho 2011

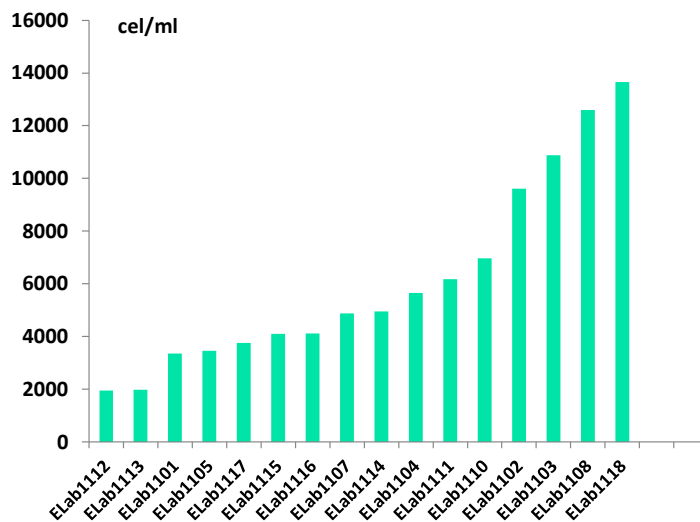


Tabela 4 – Resultados obtidos no ECI 2011

Participantes	cel/ml
ELab1112	1947
ELab1113	1980
ELab1101	3362
ELab1105	3466
ELab1117	3766
ELab1115	4098
ELab1116	4112
ELab1107	4886
ELab1114	4950
ELab1104	5654
ELab1111	6180
ELab1110	6975
ELab1102	9604
ELab1103	10882
ELab1108	12593
ELab1118	13654
média	6132
SD	3653
CV%	59,6
n=16	

Fig. 3 – Resultados referentes à análise quantitativa de Fitoplâncton (cel/ml)

Na Fig.4 podem ser observados os resultados do esforço de contagem vs precisão referentes aos participantes no Exercício Comparação Interlaboratorial (ECI) de 2011 para a **amostra C - Caldeirão**. Todos os participantes efectuaram um esforço de contagem acima do patamar exigido para uma contagem estatisticamente significativa.

Os resultados referentes à análise quantitativa de fitoplâncton obtidos pelos participantes variaram entre 3 120 cel/ml (Lab1113) e 13 052 cel/ml (Lab1110) com valores de média e desvio padrão (SD) respectivamente de 6 882 e 2 890 cel/ml (Tabela 5). Os resultados da análise de fitoplâncton da amostra C – Caldeirão encontram-se representados na Fig.5.

Fitoplâncton – Amostra C – Caldeirão, Maio 2011

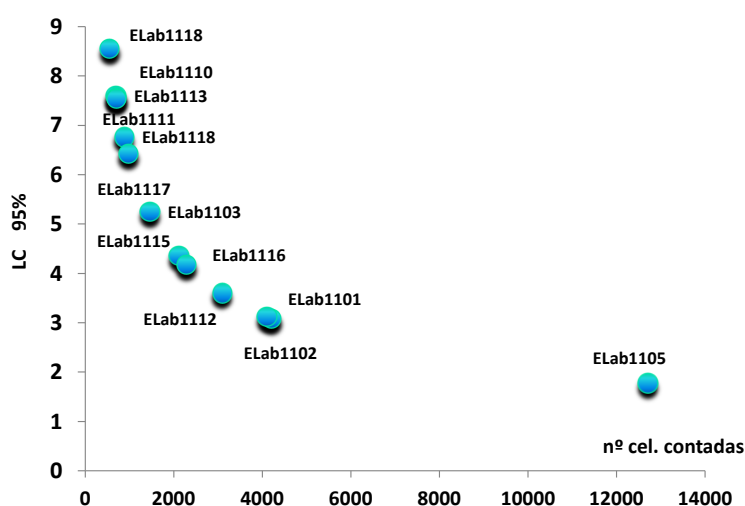


Fig.4 – Relação entre o nº de células contadas e o limite de confiança, L.C. (nível de confiança 95%).

Em relação à determinação do biovolume (mm^3/l) relativo ao exercício realizado para as cinco espécies mais abundantes na amostra B - Alvito, foi obtido o coeficiente de variação de 23,5% correspondente aos resultados de treze laboratórios. (Fig.6, Tabela 6). Considerou-se este resultado francamente bom.

Três laboratórios obtiveram resultados sobre estimados, facto que ficou a dever-se a problemas pontuais fáceis de corrigir, relacionados com a contagem de colónias na ampliação mais alta.

Fitoplâncton – Amostra C – Caldeirão, Maio 2011

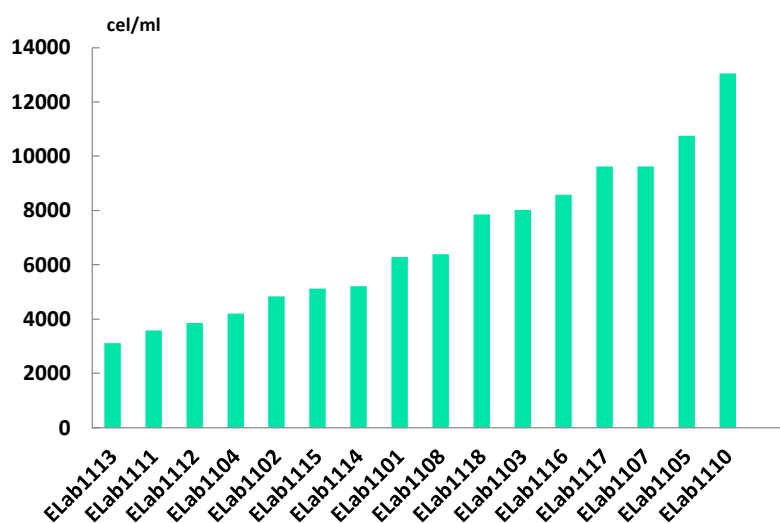


Tabela 5 – Resultados obtidos no ECI 2011

Participantes	cel/ml
Elab1113	3120
Elab1111	3575
Elab1112	3859
Elab1104	4198
Elab1102	4834
Elab1115	5120
Elab1114	5217
Elab1101	6289
Elab1108	6395
Elab1118	7856
Elab1103	8014
Elab1116	8573
Elab1117	9625
Elab1107	9629
Elab1105	10750
Elab1110	13052
média	6882
SD	2890
CV%	42,0
n=16	

Fig.5 - Resultados referentes à análise quantitativa de Fitoplâncton (cel/ml)

Biovolume do Fitoplâncton– Amostra B – Alvito, Junho 2011

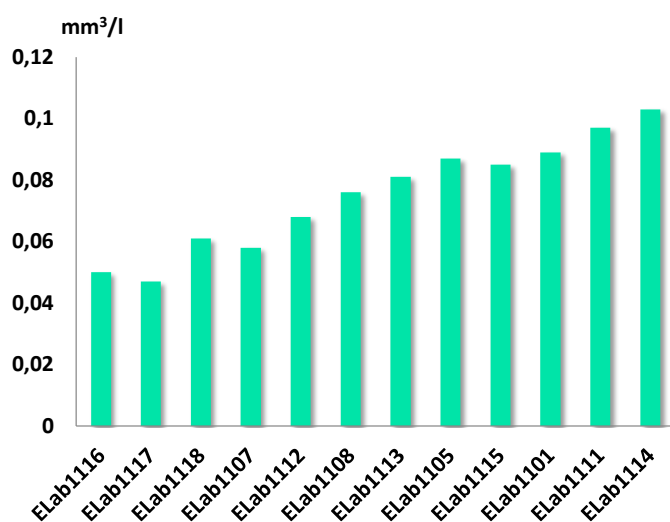


Tabela 6- Resultados obtidos no ECI 2011

Participantes	mm³/L
Elab1116	0,05
Elab1117	0,05
Elab1118	0,06
Elab1107	0,06
Elab1112	0,07
Elab1108	0,08
Elab1113	0,08
Elab1105	0,09
Elab1103	0,09
Elab1115	0,09
Elab1101	0,09
Elab1111	0,10
Elab1114	0,10
média	0,08
SD	0,02
CV%	23,5
n	13

Fig.6 – Resultados expressos em biovolume (mm³/l), para as cinco espécies de fitoplâncton mais abundantes na amostra B – Alvito, referentes a treze laboratórios.

4 - CONCLUSÕES

- Todos os participantes contaram um número total de unidades de contagem suficiente para a contagem ser estatisticamente significativa (>500) (precisão >9%, para um L.C. 95%). Este foi um dos aspectos observados que correspondeu a uma melhoria em relação aos resultados de Exercícios de Comparação Interlaboratorial (ECI) realizados anteriormente, em que nalguns casos se observaram contagens de base manifestamente insuficientes.
- No caso de alguns participantes, contudo o esforço de contagem vs precisão, pode ainda ser ajustado, reduzindo-se o esforço de contagem em função da estratégia de contagem, como sugerido no exercício prático realizado no Laboratório de Referência do Ambiente (Cabeçadas & Ferreira, 2011).
- Os coeficientes de variação entre os participantes para as amostras B e C analisadas no Exercício de Comparação Interlaboratorial de 2011 foram respectivamente de 60 e 40%. Estes resultados são considerados encorajadores para o tipo de amostras naturais.
- Em relação à determinação do biovolume (mm^3/l) segundo a metodologia proposta no exercício para as cinco espécies mais abundantes na amostra B - Alvito, foi obtido o coeficiente de variação de 23,5% correspondendo aos resultados de treze laboratórios. Considera-se este resultado francamente bom e indicando que quando os resultados são expressos em biovolume (mm^3/l) há um decréscimo acentuado de variabilidade entre os laboratórios.
- Todos os laboratórios identificaram os géneros mais importantes em termos de biovolume na **amostra B** (*Ceratium* sp. e *Staurastrum* sp.). Nesta amostra em termos de abundância foram identificados por todos os laboratórios como unidades taxonómicas mais abundantes *Merismopedia* spp. *Chroomonas/Plagioselmis* e o grupo das Chlorococcales. Todos os laboratórios identificaram os géneros mais importantes em termos de abundância na **amostra C** (*Tabellaria* sp., *Anabaena* sp. e *Fragilaria* sp.).

5 – 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.
- Cabeçadas, L. & J. Ferreira, 2011. Análise de Fitoplâncton - Exercício realizado na Agência Portuguesa do Ambiente, (APA) Laboratório de Referência do Ambiente, (LRA) em Abril/Maio 2011. Relatório, 27 pp + anexo.
- CEN, TC 230/WG 2/TG 3, 2007. Draft Proposal of “ Phytoplankton biovolume determination using inverted microscopy (Utermöhl technique)”.
- Förster, K., 1969. Amazonische Desmidiaceen, 1 Teil: Areal Santarem. Amazoniana, Kiel, Vol. II, 5-232.
- Venrick, E. L., 1978. How many cells to count ? – In: Sournia (ed.). *Phytoplankton manual*. UNESCO Monogr. Oceanogr. Method. 6: 167-180.

ANEXO I – LISTA DAS ESPÉCIES DE FITOPLÂNCTON DAS AMOSTRAS B – ALBUFEIRA DO ALVITO E AMOSTRA C – ALBUFEIRA DO CALDEIRÃO EM 2011

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do ALVITO- Amostra B, Junho 2011

105 unidades taxonómicas identificadas

CIANOPHYCEAE

Chroococcales

R1423 *Aphanocapsa* Nägeli 1849

R1413 *Aphanocapsa delicatissima* W & G. S. West 1912

R1432 *Aphanotece* Nägeli 1849

R1476 *Merismopedia minima* Beck 1897

R1479 *Merismopedia tenuissima* Lemmermann 1898

R1481 *Merismopedia warmingiana* Lagerheim 1883 (Sin: **R1476** *Merismopedia minima* Beck 1897)

R1482 *Microcystis aeruginosa* Kützing 1846

R1487 *Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner 1898

R1510 *Snowella lacustris* (Chodat) Komárek et Hindák 1988, *Gomphosphaeria lacustris* Chodat 1898

R1522 *Woronichinia delicatula* (Skuja) Komárek et Hindák 1988

R1525 *Woronichinia naegaeliana* (Unger) Elenkin 1933, *Coelosphaerium naegelianum* Unger, *Gomphosphaeria naegeliana* (Unger) Lemmerman

Nostocales

R1548 *Anabaena* Bory De Saint Vincent ex Bornet & Flahaut 1886

R1581 *Limnothrix planctonica* (Woloszynska) M.F. Meffert 1988

R1613 *Planktothrix agardhii* (Gomont) Anagnostidis & Komárek 1988

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do ALVITO-Amostra B, Junho 2011

Oscillatoriales

R1621 *Pseudanabaena limnetica* (Skuja) M.E. Meffert 1987

R1631 *Spirulina* Turpin ex Gomont 1892

CHLOROPHYCEAE

Chlorococcales

R0489 *Ankyra judayi* (G.M. Smith) Fott 1957

R0527 *Coelastrum microporum* Nägeli in A. Braun 1855

R2269 *Coelastrum polychordum* (Korshikov) Hindák 1977

R0529 *Coelastrum pseudomicroporum* Korshikov 1953

R2510 *Coelastrum pulchrum* Schmidle 1892, *Coelastrum cambricum* Archer 1868

R0530 *Coelastrum reticulatum* (Dangeard) Senn 1899

R0535 *Coenochloris* Korshikov 1953

R0533 *Coenochloris fottii* (Hindák) Tsarenko 1990, *Eutetramorus fottii* (Hindák) Komárek 1979

R2272 *Coenochloris pyrenoidosa* Korshikov 1953

R0550 *Crucigenia tetrapedia* (Kirchner) W.& G. S. West 1902

R0555 *Crucigeniella rectangularis* (Nägeli) Komárek 1974, *Crucigenia rectangularis* (Nägeli) Gay 1891

R0571 *Dictyosphaerium pulchellum* Wood 1872

R0617 *Golenkinia* Chodat 1894

R0616 *Golenkinia radiata* Chodat 1894

R0660 *Micractinium pusillum* Fresenius 1858, *Richteriella botryoides* (Schmidle) Lemmermann, *Tetrastum multisetum* (Schmidle) Chodat

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do ALVITO-Amostra B, Junho 2011

- R0670** *Monoraphidium griffithii* (M. J. Berkeley) Komárkova-Legnorová 1969, *Ankistrodesmus acicularis* (Braun) Korshikov 1953, *Dactylococcopsis acicularis* Lemmermann 1900
- R0677** *Monoraphidium nanum* (Ehrenberg) Hindák 1980
- R0693** *Nephrocytium* Nägeli 1849
- R0705** *Oocystis* A. Braun 1855
- R0699** *Oocystis minuta* Guillard H. C. Bold & MacEntee 1975
- R0701** *Oocystis parva* W. & G. S. West 1898, *Oocystella parva* (W. et G.S. West) Hindák 1988
- R0702** *Oocystis pusilla* Hansgirg 1890
- R0723** *Pediastrum* Meyen 1829
- R0722** *Pediastrum simplex* Meyen 1829, *Pediastrum strumii* Reinsch 1867
- R2407** *Pediastrum simplex* var. *biwaense* Fukushima 1956
- R0716** *Pediastrum duplex* Meyen 1829
- R0725** *Pediastrum tetras* (Ehrenberg) Ralfs 1844
- R2112** *Raphidocelis contorta* (Schmidle) Marvan et al. 1984, *Kirchneriella contorta* var. *elongata* (G.M. Smith) Komárek 1979, *Kirchneriella contorta* (Schmidle) Bohlin 1897
- R0811** *Scenedesmus* Meyen 1829
- R0763** *Scenedesmus bicaudatus* Dedusenko 1925
- R0781** *Scenedesmus ecornis* (Ehrenberg) Chodat 1926
- R0806** *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson 1835
- R0866** *Tetrastum komareckii* Hindák 1977

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do ALVITO-Amostra B, Junho 2011

R1922 *Scenedesmus verrucosus* Y. van Roll 1925, *Scenedesmus disciformis* (Chodat) Fott & Komárek 1960

R0806 *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson 1835

R0820 *Schroederia setigera* (Schröder) Lemmermann 1898

R0993 *Sphaerocystis schroeteri* Chodat 1897, *Gloeococcus schroeteri* (Chodat) Lemmermann 1915

R0856 *Tetraëdron* Kützing 1845

R0848 *Tetraëdron minimum* (A. Braun) Hansgirg 1888, *Tetraëdron quadratum* (Reinsch) Hansgirg 1889

R0843 *Tetraëdron caudatum* (Corda) Hansgirg 1888

Volvocales

R0923 *Carteria* Diesing em. France 1893

R0941 *Clamydomonas* Ehrenberg 1834

R0935 *Clamydomonas globosa* J. Snow 1902

RXXXX *Polytoma cordatum* Skvortov

Tetrasporales

R0929 *Chlamydocapsa ampla* (Kützing) Fott 1972, *Gloeocystis ampla* Kützing

R0911 Tetrasporales Pasher 1914

R0905 Chlorophyceae Wille 1884

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do ALVITO-Amostra B, Junho 2011

CONJUGATOPHYCEAE

Desmidiales

R1176 *Closterium aciculare* T. West 1860

R1178 *Closterium acutum* Brébisson 1848

R1181 *Closterium acutum* var. *variabile* (Lemmermann) Willi Krieger 1935

R1233 *Cosmarium* Corda ex Ralfs 1848

R1309 *Staurastrum* (Meyen) Ralfs 1848

RXXXX *Staurastrum pseudosebaldi* Wille 1980, *Staurastrum manfeldtii* var. *annulatum*
W.et G.S.West 1902

R1413 *Staurastrum tetracerum* Ralfs 1948

R1282 *Staurastrum chaetoceras* (Schröder) G. M. Smith 1924

KLEBSORMIDIOPHYCEAE

Klebsormidiales

R0596 *Elakatothrix gelatinosa* Wille 1898

R0597 *Elakatothrix genevensis* (Reverdin) Hindák 1962

BACILLARIOPHYCEAE

Centrales

R0017 *Actinocyclus normanii* (Gregory) Hustedt 1957

R0020 *Aulacoseira ambigua* (Grunow) Simonsen 1979

R0021 *Aulacoseira distans* (Ehrenberg) Simonsen 1979

R0038 *Cyclostephanos dubius* (Hustedt) Round 1982, *Stephanodiscus dubius* (F. Fricke)
(Hustedt), *Cyclotella dubia* F. Fricke

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do ALVITO-Amostra B, Junho 2011

R0053 *Cyclotella* (Kützing) Brébisson 1838

R0048 *Cyclotella ocellata* Pantocsek 1901

R0062 *Melosira varians* Agardh 1827

Pennales

R0135 *Asterionella formosa* Hassall 1850

R0335 *Navicula* Bory de Saint Vincent 1822

R0394 *Nitzschia* Hassall 1845

CRYPTOPHYCEAE

Cryptomonadales

R1368 *Chroomonas acuta* Utermöhl 1925

R1394 *Cryptomonas* Ehrenberg 1832

R1378 *Cryptomonas erosa* Ehrenberg 1838

R1382 *Cryptomonas marssonii* Skuja 1948

R1384 *Cryptomonas obovata* Skuja 1948

R2557 *Plagioselmis lacustris* (Pascher & Ruttner) Javornick 2001, *Rhodomonas lacustris* Pascher & Ruttner 1913, *Rhodomonas minuta* Skuja

R2162 *Plagioselmis nannoplanctica* (H. Skuja) G. Novarino, I. A. N. Lucas & Morrall 1994, *Rhodomonas minuta* var. *nannoplanctica* Skuja,

CHRYSOPHYCEAE

Synurales

R1109 *Mallomonas* Perty 1852

R1096 *Mallomonas acaroides* Perty 1852

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do ALVITO –Amostra B, Junho 2011

R1097 *Mallomonas akrokomos* Ruttner in Pascher 1913

R1098 *Mallomonas akrokomos* var. *parvula* Conrad 1927

DINOPHYCEAE

Peridinales

R1671 *Ceratium furcoides* (Levander) Langhans 1925

R1672 *Ceratium hirundinella* (O. F. Muller) Dujardin 1841

Gymnodiniales

R1654 *Gymnodinium* F.Stein

EUGLENOPHYCEAE

Euglenales

R1721 *Euglena oxyuris* Schmarda 1846

R1735 *Phacus acuminatus* Stokes 1885

R1738 *Phacus caudatus* K. Hübner 1886

R1741 *Phacus longicauda* (Ehrenberg) Dujardin 1841

R1773 *Trachelomonas* Ehrenberg 1835

R1776 *Trachelomonas volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg 1833

R1777 *Trachelomonas volvocinopsis* Swirenko 1914

R1793 Nanofitoflagelados não identificados

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do Caldeirão—Amostra C, Maio 2011

CYANOPHYCEAE

Chroococcales

R1413 *Aphanocapsa delicatissima* W. & G. S. West 1912

Nostocales

R1548 *Anabaena* Bory de Saint Vincent ex Bornet & Flahault 1886

CHLOROPHYCEAE

Chlorococcales

R0550 *Crucigenia tetrapedia* (Kirchner) W. & G. S. West 1902

R0533 *Coenochloris fothii* (Hindák) Tsarenko 1990, *Eutetramorus fothii* (Hindák) Komárek 1979

R0571 *Dictyosphaerium pulchellum* Wood 1872

R0705 *Oocystis* A. Braun 1855

R0699 *Oocystis minuta* H.C. Guillard Bold & MacEntee 1975

R0716 *Pediastrum duplex* Meyen 1829

R0725 *Pediastrum tetras* (Ehrenberg) Ralfs 1844

R0811 *Scenedesmus* Meyen 1829

R0781 *Scenedesmus ecornis* (Ehrenberg) Chodat 1926

R0806 *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson 1835

R0832 Chlorococcales não identificadas

Tetrasporales

R0906 *Paulschulzia pseudovolvox* (Schulze) Skuja 1948

R0908- *Paulschulzia tenera* (Korshikov) J.W.G. Lund 1960

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do Caldeirão-Amostra C, Maio 2011

R0912 Tetrasporales Pasher 1914

Volvocales

R0923 *Carteria* Diesing em. France 1893

R0941 *Clamydomonas* Ehrenberg 1834

R0935 *Clamydomonas globosa* J. Snow 1902

R0964 *Eudorina* Ehrenberg 1831

R0998 *Eudorina elegans* Ehrenberg 1831

R0980 *Polytoma* Ehrenberg 1838

RXXXX *Polytoma cordatum* Skvortzov

R2211 *Volvox* (Linnaeus) Ehrenberg 1838

R0998 *Volvox aureus* Ehrenberg 1832

R0905 Chlorophyceae Wille 1884

BACILLARIOPHYCEAE

Centrales

R0020 *Aulacoseira ambigua* (Grunow) Simonsen 1979; *Melosira ambigua* (Grunow) O. Müller

R0023 *Aulacoseira granulata* (Ehrenberg) Simonsen 1979

R0053 *Cyclotella* (Kützing) Brébisson 1838

R2060 *Discostella stelligera* (Cleve & Grunow) Houk & Klee 2004

Fitoplâncton - Lista de Espécies – Albufeira do Caldeirão-Amostra B, Maio 2011

Pennales

R0135 *Asterionella formosa* Hassall 1850

R0223 *Fragilaria crotonensis* Kitton 1869

R0335 *Navicula* Bory de Saint Vincent 1822

R0440 *Tabellaria fenestrata* (Lyngbye) Kutzing 1844

R0442 *Tabellaria flocculosa* (Roth) Kützing 1844

CRYPTOPHYCEAE

Cryptomonadales

R1368 *Chroomonas acuta* Utermöhl 1925

R1382 *Cryptomonas marssonii* Skuja 1948

R1394 *Cryptomonas* Ehrenberg 1838

R2162 *Plagioselmis nannoplanctica* (H. Skuja) G. Novarino, I. A. N. Lucas & Morrall 1994, *Rhodomonas minuta* var. *nannoplanctica* Skuja,

EUGLENOPHYCEAE

Euglenales

R1773 *Trachelomonas* Ehrenberg 1835

CHRYSOPHYCEAE

Chromulinales

R1115 *Monas* M. F. Müller 1773

R1171 Chrysophyceae Pasher

ANEXO II - REFERÊNCIAS - IDENTIFICAÇÃO DE FITOPLÂNCTON DE ÁGUA DOCE

- Recentes monografias das séries *Süßwasserflora von Mitteleuropa* compiladas por A. Pascher e *Das Phytoplankton des Süßwassers*, segundo G. Huber-Pestalozzi.
- Taxonomia das **Chroococcales** actualizada segundo Komárek, J. & K. Anagnostidis (1968).
- Taxonomia das **Nostocales** actualizada de acordo com artigos específicos (e.g. Komarková-Legnerová & Eloranta 1992).
- Taxonomia das **Oscillatoriales** actualizada segundo Anagnostidis & Komárek (1988) e Komarková-Legnerová & Cronberg (1992).
- Taxonomia das **Stigonematales** actualizada segundo Anagnostidis & Komárek (1990).

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

Anagnostidis, K. & J. Komárek, 1990. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 5 - Stigonematales. *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.*, **59**: 1-73 .

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*. Almquist & Wiksells, Bokryckeri, Stockholm, 1580 pp.
- Cox, E. J., 1996. *Identification of the freshwater diatoms from live material*. London, Chapman & Hall.
- Cronberg, G., Carpenter, E. J. & W. W. Carmichael, 2004. *Taxonomy of harmful cyanobacteria*. - In Hallegraff, G. M., Anderson, D. M. & A. D. Cembella, (eds.), UNESCO, Monographs on Oceanographic Methodology, p. 523-562.
- Geitler, L., 1932. Cyanophyceae. Leipzig. In *Rabenhorst's Kryptogamen-Flora* 14. Johnason reprint Corporation, N.Y., 1196 p.
- Javornický, P., 2003. Taxonomic notes on some freshwater planktonic Cryptophyceae based on light microscopy. *Hydrobiologia* **502** (Dev. Hydrobiol. 172): 271–283.
- John, D., Whitton, B. & A. Brook, 2011. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*, 2nd ed., Cambridge Univ. Press, Cambridge, 878pp + DVD.
- Komárek, J. & K. Anagnostidis, 1968. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 2 – Chroococcales. *Algol. Stud.*, **73**: 157-226.
- Komáreck, J. & K. Anagnostidis, 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 3 - Nostocales. *Arch Hydrobiol. Suppl.*, **82**: 247-345.
- Komáreck, J. & H. Kling, 1991. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). *Algol. Stud.*, **61**: 21-45.
- 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., Algol. Stud.*, **67**: 103-133.
- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot, 1991. *Bacillariophyceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa*, 2, 3, Jena, Stuttgart, New York, Gustav Fischer Verlag, pp. 576

- Krammer, K. & H. Lange-Bertalot, 2000 *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Band 2. Bacillariophyceae. English and French translation of the keys, Vol 5. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- Håkansson, H., 2002. A compilation and evaluation of species in the genera *Stephanodiscus*, *Cyclostephanos* and *Cyclotella* with a new genus in the family Stephanodiscaceae. *Diatom Research* **17**: 1–139.
- Houk, V. & R. Klee, 2004. The stelligeroid taxa of the genus *Cyclotella* (Kützing) Brébisson (Bacillariophyceae) and their transfer into the new genus *Discostella*. *Diatom Research* **19**: 203–228.
- Hubber-Pestalozzi, G., 1984. Die Binnengewässer. *Das Phytoplankton des Süßwassers* Band **16** Teil **1-7**, Stuttgart : Schweizerbartsche Verlag.
- Novarino, G., Lucas, I & S. Morrall, 1994. Observations on the genus *Plagioselmis* (Cryptophyceae). *Cryptogamie, Algologie* **15**: 87–107.
- Prescott, G. W., Bicudo, E. de M. & W. C. Vinyard, 1982. A Synopsis of North American Desmids. II, Desmidiaceae: Placodermae Section 4. Univ. Nebraska Press. Lincoln, Nebraska. 700 pp. 294-447 pls.
- Round, F. E, Crawford, R. M. & D. G. Mann, 1990. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. New York, Cambridge University Press. 747 p.
- Van Heurck, H., 1963. *Traité des Diatomées*. J.R. Hansen, Bruxelles, 569p.