

PROTÓCOLOS DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – Águas de Transição e Costeiras





FICHA TÉCNICA

DRH/DEQA
2021

ÍNDICE

Índice

ÍNDICE	3
APRESENTAÇÃO	4
ELEMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SUPORTE	5
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – ELEMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS DE SUPORTE	6
FITOPLÂNCTON	13
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – FITOPLÂNCTON.....	14
MACROALGAS (OPORTUNISTAS)	23
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – MACROALGAS OPORTUNISTAS.....	24
MACROALGAS (SUBSTRATO ROCHOSO).....	28
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – MACROALGAS SUBSTRATO ROCHOSO.....	29
ERVAS MARINHAS	44
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – ERVAS MARINHAS	45
SAPAIS	51
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – SAPAIS.....	52
MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS	59
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS.....	60
FAUNA PISCÍCOLA.....	71
PROTOCOLO DE AMOSTRAGEM E PROCESSAMENTO LABORATORIAL – FAUNA PISCÍCOLA	72

APRESENTAÇÃO

A Diretiva-Quadro da Água (DQA), Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de outubro de 2000, teve por base o reconhecimento da necessidade de estabelecer uma abordagem comunitária centrada na proteção integrada dos recursos hídricos, bem como dos ecossistemas que deles dependem e de assegurar a sustentabilidade dos usos da água e o controlo da poluição. Esta Diretiva configura-se como o principal instrumento da política da União Europeia relativo à água, estabelecendo a obrigatoriedade, transversal aos Estados Membros, de planear as respetivas políticas com vista a assegurar a proteção, melhoria e recuperação das massas de água superficiais e subterrâneas, com o objetivo de assegurar que estas alcançam o Bom estado e de evitar a sua degradação.

A classificação das massas de água, paralelamente à implementação de programas de monitorização consistentes e de elevada exigência – em termos de amostragem, determinação laboratorial e domínio de áreas de conhecimento específicas –, desempenham um papel fundamental no processo de implementação da Diretiva, nomeadamente na definição dos objetivos ambientais e conceptualização e operacionalização dos programas de medidas no âmbito dos Planos de Gestão de Região Hidrográfica.

Neste contexto, torna-se fundamental padronizar os procedimentos de campo e processamento laboratorial, por forma a minimizar os erros e garantir a comparabilidade dos processos de monitorização e classificação das massas de água. Assim, neste documento são apresentados os protocolos de amostragem e processamento laboratorial desenvolvidos no âmbito da implementação da DQA para as massas de água de transição e costeiras. A elaboração destes protocolos teve por base os trabalhos dos projetos EEMA - Avaliação do Estado Ecológico das Massas de Águas Costeiras e de Transição Adjacentes e do Potencial Ecológico das Massas de Água Fortemente Modificadas (POVT-03-0133-FCOES-000017) e MESCLA - Melhorar e complementar os critérios de classificação das massas de água de transição e costeiras (POSEUR-03-2013-FC-000001), bem como os resultados do exercício de intercalibração promovido pela Comissão Europeia e os requisitos estabelecidos em normas nacionais e internacionais.

Para facilidade de consulta, estes protocolos encontram-se organizados em forma de fichas para cada um dos elementos de qualidade a avaliar - elementos químicos e físico-químicos de suporte, fitoplâncton, macroalgas (oportunistas e de substrato rochoso), ervas marinhas (ou prados marinhos), sapais, macroinvertebrados bentónicos e fauna piscícola -, conforme se apresenta de seguida.

Elementos físico-químicos de soporte



Elementos Físico-químicos de suporte aos biológicos

Águas de Transição e Costeiras

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

O presente protocolo procura sistematizar os procedimentos de amostragem e processamento laboratorial para os elementos físico-químicos de suporte aos biológicos, por forma a uniformizar a metodologia subjacente à classificação das massas de água.

Para os poluentes específicos e substâncias prioritárias devem ser seguidas as orientações do laboratório que realiza as análises no que se refere a recipientes, recolha e conservação das amostras.

Aplicabilidade

O protocolo de amostragem para os elementos físico-químicos de suporte aos biológicos aplica-se a todas as tipologias de águas de transição e costeiras.

Antes de iniciar os trabalhos, todas as autorizações ou licenças necessárias devem ser obtidas junto das autoridades competentes.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

Para as águas costeiras o protocolo prevê a realização de amostragens nas quatro estações do ano (primavera, verão, outono e inverno), com recolhas de água à superfície. No caso dos estuários e lagoas costeiras, pela sua variabilidade espacial e temporal e maior pressão antrópica, caso a profundidade seja superior a dois metros ou a coluna de água se apresente estratificada, devem ser recolhidas amostras à superfície e junto ao fundo. Deve também ser contemplada a realização de amostragens em baixa-mar e em preia-mar.

Material e equipamento

O material necessário deve ser organizado antes da saída de campo, de acordo com a seguinte lista:

- Disco de Secchi de 20cm de diâmetro, com dois quadrantes brancos e dois quadrantes pretos (intercalados), com cabo marcado de 25cm em 25cm (pelo menos). Comprimento do cabo (15-20m) deve ter em atenção os locais de amostragem, *e.g.*, altura das pontes;
- Garrafa de amostragem (Van Dorn ou Niskin horizontal). Comprimento do cabo deve cumprir os requerimentos mencionados no ponto anterior;
- Folhas de registo, com base e lápis;
- Máquina fotográfica / telemóvel com capacidade de recolha de imagem;
- Vasilhame para recolha de amostras, de acordo com instruções do laboratório de análises. Por exemplo, três frascos de plástico de colheita (2L-5L, dependendo do volume necessário para cada estação) por cada ponto amostragem para sólidos suspensos totais (SST) e nutrientes, três frascos de plástico de colheita (150mL, dependendo do volume necessário para cada estação) por cada ponto amostragem para nutrientes de fundo, vasilhame para a recolha de contaminantes e metais, etc;
- Sonda multiparamétrica [temperatura, salinidade, pH, oxigénio dissolvido (percentagem de saturação e concentração absoluta)];
- Arca térmica para conservação de amostras, com termoacumuladores.

Seleção dos locais de amostragem

O número e a localização das estações de amostragem estão principalmente dependentes de fatores como a dimensão da massa de água ou as fontes de pressão existentes. De modo a assegurar uma boa

Elementos Físico-químicos de suporte aos biológicos

Águas de Transição e Costeiras

representatividade da massa de água, o número de estações de amostragem deverá aumentar de modo proporcional à sua dimensão e heterogeneidade. No mínimo, deve ser definida uma estação por massa de água. As estações de amostragem para os elementos químicos e físico-químicos de suporte aos biológicos são coincidentes, no tempo e no espaço, com as estações e momentos de amostragem dos elementos biológicos, para que sirvam de referência às condições ambientais que os influenciam. Poderá haver amostragens ou estações de amostragem em número superior às amostragens de elementos biológicos.

Procedimento de amostragem

Preparação do material de colheita, etiquetando previamente todos os frascos de colheita necessários por estação de amostragem.

Começar por preencher uma folha de campo garantindo que a informação necessária é adicionada a todos os campos presentes, de forma sistemática e legível.

Devem também ser tiradas fotografias do local de amostragem e em redor.

Efetuar as medições com a sonda multiparamétrica, de forma a caracterizar a coluna de água, evitando sempre o seu contacto com o fundo e registando os parâmetros obtidos fazendo uso do melhor conhecimento científico e sentido crítico. Determinar se há existência de estratificação da coluna de água. Havendo diferença significativa entre os valores de temperatura e salinidade de superfície e de fundo, o perfil deve ser realizado em pelo menos dois pontos intermédios da coluna de água.

Os valores da temperatura, salinidade e oxigenação da água (em mg/L e % de saturação) são registados com recurso a sonda multiparamétrica. A medição do parâmetro salinidade é fundamental para a aplicação dos sistemas de classificação. No caso das lagoas costeiras é também fundamental anotar se a lagoa se encontra aberta ou fechada ao mar.



Figura 1 – Exemplo de sonda multiparamétrica com cabo de medição da profundidade

O parâmetro transparência é determinado pela profundidade de Secchi, medido através do lançamento do disco na vertical, na sombra da embarcação, e registando a média entre as profundidades de descida e de subida à qual aquele deixa de se ver.

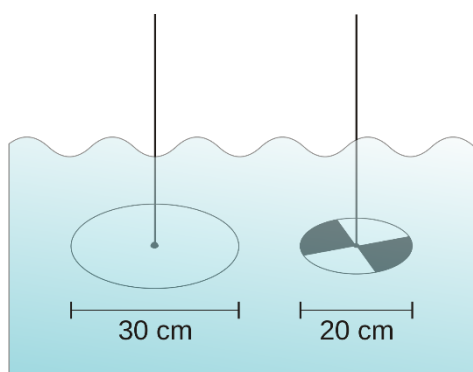


Figura 2 – Tipos de discos de Secchi (fonte: wikipedia)

Elementos Físico-químicos de suporte aos biológicos

Águas de Transição e Costeiras

De modo a garantir as melhores condições da amostra, a água deverá ser recolhida com garrafa de Van Dorn ou Niskin (horizontais), garantindo que todo o material de recolha seja lavado três vezes com água da amostra antes de ser efetuada a sua colheita e acondicionamento. Em cada estação, devem ser recolhidas amostras suficientes para assegurar o enchimento correto de todo o vasilhame e, conseqüentemente, a análise de todos os parâmetros previstos em cada ponto de amostragem, de acordo com instruções do laboratório de análises.

Sempre que a profundidade ou a estratificação o exigirem, serão recolhidos também três replicados com garrafa horizontal, junto ao fundo, para quantificação de nutrientes. A água deverá então ser transferida para os frascos de colheita. De notar que o volume amostrado tem de ser ajustado ao sistema e estação de amostragem (águas mais transparentes requerem uma amostra com maior volume, devendo nestes casos ser recolhido pelo menos o dobro do volume de água).

Durante a amostragem de fundo, ter extrema atenção para não deixar a garrafa bater no substrato. Tentar evitar a entrada de macroalgas e resíduos vegetais.

As amostras deverão ser acondicionadas em arcas térmicas mantidas num local fresco e seco e, em laboratório, em condições adequadas de refrigeração.

A água recolhida deverá ser filtrada o mais brevemente possível, de modo a minimizar alterações nas concentrações dos nutrientes. A filtração é efetuada com filtros adequados ao objetivo da análise, sendo o recomendado serem de policarbonato (Nucleopore/Whatman ou equivalente), com poro 0,4µm, para obter a fração dissolvida. Depois de filtrada, a amostra deve ser acondicionada num frasco de 100-250mL (depende do volume necessário em cada laboratório) onde será conservada (congelada) até análise.

A recolha de amostras de água para análise dos parâmetros do estado químico e poluentes específicos decorre em simultâneo e nas mesmas estações de amostragem que para os restantes elementos físico-químicos. São feitas recolhas subsuperficiais e as amostras acondicionadas em frascos convenientemente identificados e etiquetados, conservados em arcas térmicas no escuro e refrigerados, seguindo todas as orientações e recomendações do laboratório encarregue da análise.

Parâmetros

Os parâmetros a analisar dividem-se em físico-químicos gerais, substâncias prioritárias (elementos do estado químico) e poluentes específicos.

No que se refere aos elementos físico-químicos gerais devem ser analisados os seguintes parâmetros:

- Temperatura (°C)
- pH
- Condutividade (µS/cm), indicando a temperatura a que é medida
- Salinidade (PSU)
- Oxigénio dissolvido (mg O₂/L)
- Saturação de oxigénio (% de saturação de O₂)
- Transparência (disco de Secchi) (m)
- Sólidos suspensos totais (mg/L)
- Nitrato (NO₃) (mg N/L)
- Nitrito (NO₂) (mg N/L)
- Azoto amoniacal (NH₄) (mg N/L)
- Azoto total (mg N/L)
- Fosfato (PO₄) (mg P/L)
- Fósforo total (mg P/L)
- Silicato (mg Si/L)

A lista de poluentes específicos aplicável às massas de água de transição e costeiras é composta pelas seguintes substâncias:

- 2,4,5-Triclorofenol [CAS 95-95-4]
- 2,4,6-Triclorofenol [CAS 88-06-2]

Elementos Físico-químicos de suporte aos biológicos

Águas de Transição e Costeiras

- 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético - sais e ésteres) [CAS 94-75-7]
- 2,4-Diclorofenol [CAS 120-83-2]
- 3,4-Dicloroanilina [CAS 95-76-1]
- Antimônio dissolvido [CAS 7440-36-0]
- Arsênio dissolvido [CAS 7440-38-2]
- Bário dissolvido [CAS 7440-39-3]
- Bentazona [CAS 25057-89-0]
- Cobre dissolvido [CAS 7440-50-8]
- Crômio dissolvido [CAS 7440-47-3]
- Dimetoato [CAS 60-51-5]
- Etilbenzeno [CAS 100-41-4]
- Fosfato de tributilo [CAS 126-73-8]
- Linurão [CAS 330-55-2]
- MCPP (Mecoprope) [CAS 93-65-2]
- Xileno (total) [CAS 1330-20-7]
- Tolueno [CAS 108-88-3]; Zinco [CAS 7440-66-6]
- Terbutilazina [CAS 5915-41-3]
- Desetil Terbutilazina [CAS 30125-63-4]
- Cianetos livres (HCN) [CAS 57-12-5]

A lista de Substâncias Prioritárias aplicável às massas de água de transição e costeiras é a seguinte:

- Alacloro [CAS 15972-60-8]
- Antraceno [CAS 120-12-7]
- Atrazina [CAS 1912-24-9]
- Benzeno [CAS 71-43-2]
- Cádmiio e compostos de cádmio [CAS 7440-43-9]
- Tetracloroeto de carbono [CAS 56-23-5]
- Cloroalcanos C10-13 [CAS 85535-84-8]
- Clorfenvinfos [CAS 470-90-6]
- Clorpirifos (Clorpirifos-etilo) [CAS 2921-88-2]
- Aldrina [CAS 309-00-2]
- Dieldrina [CAS 60-57-1]
- Endrina [CAS 72-20-8]
- Isodrina [CAS 465-73-6]
- DDT total [Sem CAS]
- p, p-DDT [CAS 50-29-3]
- 1,2-Dicloroetano [CAS 107-06-2]
- Diclorometano [CAS 75-09-2]
- Ftalato de di(2-etil-hexilo) (DEHP) [CAS 117-81-7]
- Diurão [CAS 330-54-1]
- Endossulfão [CAS 115-29-7]
- Fluoranteno [CAS 206-44-0]
- Hexaclorociclohexano [CAS 608-73-1]
- Isoproturão [CAS 34123-59-6]
- Chumbo e compostos de chumbo [CAS 7439-92-1]
- Naftaleno [CAS 91-20-3]
- Níquel e compostos de níquel [CAS 7440-02-0]
- Nonilfenóis (4-nonilfenol) [CAS 84852-15-3]
- Octilfenóis ((4-(1,1',3,3'-tetrametilbutil)-fenol)) [CAS 140-66-9]
- Pentaclorobenzeno [CAS 608-93-5]

Elementos Físico-químicos de suporte aos biológicos

Águas de Transição e Costeiras

- Pentaclorofenol [CAS 87-86-5]
- Benzo(a)pireno [CAS 50-32-8]
- Simazina [CAS 122-34-9]
- Tetracloroetileno [CAS 127-18-4]
- Tricloroetileno [CAS 79-01-6]
- Compostos de tributilestanho (catião tributilestanho) [CAS 36643-28-4]
- Triclorobenzenos [CAS 12002-48-1]
- Triclorometano [CAS 67-66-3]
- Trifluralina [CAS 1582-09-8]
- Dicofol [CAS 115-32-2]
- Ácido perfluorooctanossulfônico e seus derivados (PFOS) [CAS 1763-23-1]
- Quinoxifena [CAS 124495-18-7]
- Aclonifena [CAS 74070-46-5]
- Bifenox [CAS 42576-02-3]
- Cibutrina [CAS 28159-98-0]
- Cipermetrina [CAS 52315-07-8]
- Diclorvos [CAS 62-73-7]
- Hexabromociclododecano (HBCDD) [Sem CAS]
- Heptacloro [CAS 76-44-8]
- Heptacloro epóxido [CAS 1024-57-3]
- Terbutrina [CAS 886-50-0]

Refira-se, no entanto, que a lista das substâncias prioritárias a monitorizar deve acompanhar as disposições da respetiva Diretiva, e ser atualizada sempre que necessário.

A seleção dos parâmetros a monitorizar deve ser realizada de acordo com as pressões antrópicas na bacia hidrográfica drenante e os objetivos do programa de monitorização.

Os metais devem ser sempre analisados na forma dissolvida.

Procedimento laboratorial

Nutrientes

Para a quantificação dos nutrientes (nitrato, nitrito, azoto amoniacal, fosfato e silicato), sugere-se a utilização de um autoanalisador. Para cada análise devem ser verificados os métodos descritos pela marca do equipamento, adaptados à salinidade da amostra.

Devem ser também quantificados o azoto e o fósforo total, presentes na fração dissolvida, após digestão da amostra. Se o equipamento a utilizar não estiver equipado com digestor por UV, então a digestão da fração dissolvida deverá ser feita externamente.

Os limites de quantificação dos métodos de análise devem ser os adequados para garantir a aplicação dos sistemas de classificação da DQA.

Sólidos Suspensos Totais e Matéria Orgânica

Para quantificação dos sólidos suspensos totais (SST) e da matéria orgânica em suspensão (MO), que constituem os principais elementos a condicionar a transparência da água, deve proceder-se à filtração das amostras de água para que se possam analisar as partículas nela suspensas.

Deverão utilizar-se filtros GF/F 47mm previamente muflados e pesados. A filtração deve ser efetuada por períodos inferiores a 30 minutos, evitando-se que o filtro colmate ou seque, e registando o volume filtrado para cada replicado. No final, passar 20mL de água ultrapura pelas paredes do copo de filtração e seguidamente a extremidade do filtro (retirando o copo) com 10mL também de água ultrapura, gota a gota. Terminada a filtração, retirar o filtro sem dobrar e voltar a colocar na caixa de Petri respetiva (que foi

Elementos Físico-químicos de suporte aos biológicos

Águas de Transição e Costeiras

previamente preparada e identificada durante a preparação do filtro). Se não for possível avançar imediatamente para o processamento das amostras, os filtros, nas respetivas caixas, devem ser congelados a -20°C até um período máximo de três semanas.

Processamento de SST

Se os filtros estiverem armazenados no frio, devem deixar-se descongelar até atingirem a temperatura ambiente, durante cerca de 30 min. Levar a secar a 60°C na estufa, acompanhados pela caixa de Petri onde é registado o código atribuído ao filtro, por cerca de 2h até ser extraída toda a humidade. Seguidamente colocar os filtros a arrefecer no exsiccador. Quando atingirem a temperatura ambiente, pesar em balança de precisão. Repetir a secagem e a pesagem para verificação da eficiência da secagem. Se houver variação superior a 0,2mg repetir a secagem e a pesagem uma terceira vez. Tal deve ser feito até que não se verifique variação de peso dos filtros entre duas pesagens consecutivas (usar o total de tempo necessário para a estabilização do peso nas próximas determinações de SST). Os pesos devem ser registados para cada filtro, seguindo o código anteriormente atribuído.

Quantificação de SST

A quantidade de SST é calculada através da equação:

$$SST \text{ (g/L)} = (Pf - Pi)/V$$

Onde:

- Pf = peso depois de filtrar a amostra, depois de seco (g)
- Pi = peso inicial dos filtros (g)
- V = volume filtrado (L)

Processamento de Matéria Orgânica

Após o correto processamento dos SST, levar os filtros a queimar na mufla a 450°C durante quatro horas (240 min.) e repetir a pesagem para quantificar a matéria orgânica em suspensão. A pesagem deve ser efetuada duas vezes, os filtros entre as pesagens devem ser mantidos no exsiccador.

Quantificação de Matéria Orgânica

A quantidade de MO é calculada utilizando o valor de SST

$$MO \text{ (g/L)} = (Pf - PM)/V$$

Onde:

- Pf = peso após filtrar a amostra, depois de seco (g)
- PM = peso após filtrar a amostra, depois de muflar (g)
- V = volume filtrado (L)

Nota:

Os filtros devem ser sempre acompanhados pelos brancos previamente preparados.

A balança de precisão deve ser tarada e precisa até à 10⁻⁴g. Colocar uma pequena peça de plástico para o filtro não tocar na bandeja.

Normas de segurança

O ambiente marinho e estuarino em que decorrem as amostragens dos elementos químicos e físico-químicos de suporte pode ser perigoso, quer no sentido de se estar diretamente em contacto com a água, quer no sentido de se estar dependente da segurança e meios a bordo da embarcação usada no trabalho. Dependendo do local, a embarcação pode oscilar com o vento ou a ondulação, aumentando o risco de queda à água. Pode, também, haver enclanhamentos devido à profundidade dos leitos onde decorrem as amostragens. Desta forma, tentando minimizar o risco de acidente, todas as pessoas que recorram a embarcações para a realização deste tipo de amostragens, devem usar equipamento adequado a estes meios, como seja o colete

Elementos Físico-químicos de suporte aos biológicos

Águas de Transição e Costeiras

salva-vidas, roupas e agasalhos largos (para não impedirem os movimentos) mas sem pontas soltas (para não ficar preso em algum sítio), chapéu e protetor solar, luvas de trabalho, calçado aderente e adequado.

O trabalho de campo nunca deve ser realizado por uma só pessoa, adequando-se o seu número à dimensão ou complexidade da tarefa a desenvolver (no mínimo duas pessoas). O responsável da embarcação deverá acautelar que toda a palamenta está a bordo e é adequada às características e número dos tripulantes. Todo o equipamento deve ser guardado/mantido em segurança durante toda a operação (deslocações ou amostragem), de forma a não haver danos ou perdas.

Os frascos de amostragem devem ser bem-acondicionados dentro das arcas térmicas, de forma que não se partam durante a viagem. As amostras devem ser mantidas nas condições de conservação adequadas durante todo o tempo em que decorra a amostragem.

No laboratório, devem ser usadas roupas adequadas ao trabalho a desenvolver (batas, luvas, calçado, etc.), seguindo as normas do próprio laboratório. As amostras devem ser acondicionadas de forma adequada, atendendo-se aos prazos e condições ideais de conservação das amostras e assegurar que o seu processamento é feito dentro dos limites temporais recomendados.

Controlo de qualidade

O controlo de qualidade é assegurado pelo cumprimento rigoroso dos protocolos de amostragem e processamento laboratorial estabelecidos para cada parâmetro analisado e pelo cumprimento das orientações do laboratório que realiza as análises.

Bibliografia

Brito A.C., Boia A., Camarão B., Cardoso I., Cardoso I.*, Cereja R., Cruz J., Gamito S., Garcia C., Gonçalves J.M.S., Heumüller J., Pedro P., Rocha C., Silva G., Neto J.M. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. II – Elementos Químicos e Físico-Químicos. APA/MONIPOR, 67p.

Lorenzen, C.J. (1967) Determination of Chlorophyll and Pheopigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, 12, 343-346. <http://dx.doi.org/10.4319/lo.1967.12.2.0343>

Moita, M.T. & Vilarinho, M.G. (1999). Check-list of phytoplankton species off Portugal: 70 years (1929-1998) of studies. *Portugalia Acta Biológica, Sér.B, Sist*, 18: 5-50.

FITOPLÂNCTON



Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

O presente protocolo procura sistematizar medidas orientadoras, no sentido de uniformizar os procedimentos de amostragem e análise do elemento de qualidade biológica fitoplâncton, com vista à classificação do seu estado ecológico. São referidas as orientações e procedimentos de amostragem e de laboratório, de modo a garantir a comparabilidade dos resultados entre diferentes operadores e entidades. A elaboração do protocolo teve por base a experiência existente em Portugal e os conhecimentos técnico-científicos descritos na bibliografia da especialidade.

A monitorização e classificação da massa de água, nos termos da DQA, pressupõe o correto planeamento e cumprimento rigoroso do protocolo de amostragem e processamento laboratorial estabelecido.

Aplicabilidade

Este protocolo aplica-se a todas as tipologias de massa de água de transição e costeiras de Portugal continental.

Antes de iniciar os trabalhos, todas as autorizações ou licenças necessárias devem ser obtidas junto das autoridades competentes.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

Apesar de a DQA prever, para o elemento de qualidade biológica fitoplâncton, amostragens de seis em seis meses, durante a fase de desenvolvimento do método de avaliação e, posteriormente, durante o exercício de intercalibração da estratégia comum de implementação da DQA, percebeu-se que esta frequência é manifestamente insuficiente. Desta forma, decidiu-se que o método a aplicar a nível nacional deveria ter uma frequência mínima de seis amostragens por ano por se considerar que este planeamento é mais adequado para a avaliação da qualidade ecológica com base neste elemento biológico.

Sendo assim, a frequência de amostragem para o fitoplâncton será de seis vezes/ano, devendo ser coincidente com a época de crescimento, entre fevereiro e outubro. As amostras recolhidas nos meses de novembro, dezembro e janeiro não serão consideradas para a classificação das massas de água. Das seis colheitas, três devem ter um intervalo mínimo de três semanas no período de verão (junho a setembro).

A classificação da qualidade ecológica poderá ser realizada anualmente. No entanto, recomenda-se que se utilize um conjunto de três anos consecutivos de dados de fitoplâncton, de forma que a classificação possa integrar a variabilidade interanual e despiste eventuais observações díspares.

Material e equipamento

Material e equipamento para o trabalho de campo:

- Folhas de registo, com base e lápis;
- Garrafa de amostragem (Van Dorn ou Niskin horizontal). O cabo deve ter 15 a 20m, mas deve ser ajustado ao local de amostragem, pois pode ser necessário mais ou menos cabo. O cabo deve estar marcado de 25 em 25cm, pelo menos;
- Máquina fotográfica;
- Balde;
- Funis;
- Copo plástico graduado (100mL);
- 3 frascos de colheita escuros (1,5-5L, dependendo do volume necessário para cada estação) por ponto de amostragem (triplicados);

Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

- Sonda multiparamétrica (obrigatório registrar a salinidade, caso não seja possível, medir em laboratório)
- Arca térmica para preservação das amostras, com termoacumuladores;
- Frascos de vidro âmbar 125mL com 1,5mL de solução de Lugol (pode ser adicionado previamente no laboratório).

Nota: Todas as amostras devem ser devidamente etiquetadas incluindo as seguintes informações: sistema, ponto de amostragem, replicado, profundidade e data.

Material, equipamento e reagentes para o processamento laboratorial

- Ficha de laboratório para registrar informação relevante (*e.g.*, os volumes filtrados);
- Bomba de vácuo com manómetro;
- Rampa de filtração para filtros de 47mm de diâmetro e respetivos copos;
- Filtros de fibra de vidro diâmetro 47 μ m não muflados (*e.g.*, Whatman GF/F de 0,7 μ m de porosidade nominal ou equivalente);
- Espectrofotómetro com largura de banda inferior ou igual a 2,0nm;
- *Cuvettes* de quartzo, de percurso ótico de 1cm, para leituras em espectrofotómetro;
- Agitador de bancada;
- Centrifugadora;
- Provetas graduadas;
- Pinça de pontas lisas e chatas;
- Varetas de vidro;
- Tubos de ensaio de 10mL de capacidade, com rolha, resistentes a solventes orgânicos;
- Micropipetas de volume variável (2-20 μ L, 0,5-5mL);
- Pontas descartáveis de micropipetas;
- Papel de alumínio;
- Etiquetas;
- Extran® 1%
- Solução aquosa de acetona a 90% (v/v): Adicionar num balão volumétrico de 100mL, 90mL de acetona a 100% e 10mL de água destilada ou equivalente (medidos em proveta graduada). Homogeneizar a solução e guardar em frasco de vidro vedado;
- Solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,5M. A solução deve ser guardada em frasco de vidro escuro e devidamente vedado;
- Solução de Lugol neutra: dissolver 20g de iodeto de potássio em 40mL água destilada, adicionar 10g de cristais de iodo e 100mL água destilada. Finalmente, adicionar 10g de acetato de sódio.

Seleção dos locais de amostragem

Os locais de amostragem do elemento de qualidade biológica fitoplâncton devem ser selecionados tendo em conta uma série de condicionantes, como por exemplo:

- Devem-se manter as estações de monitorização previamente estabelecidas, no âmbito da DQA, e para as quais há já dados históricos para se fazer um acompanhamento temporal;
- Deve-se garantir que as amostragens do fitoplâncton são realizadas nos mesmos locais e no mesmo período temporal que os parâmetros físico-químicos;
- Deve-se cobrir espacialmente a massa de água. Massas de água muito extensas devem ter mais do que uma estação de amostragem para garantir a representatividade da massa de água. Estas considerações devem ser feitas caso a caso;
- As estações não se devem localizar nas margens, onde podem sofrer influência de fatores externos, como a ressuspensão de sedimentos ou microalgas benthicas;
- Deve-se evitar recolhas de água em colunas de água pouco profundas;
- Locais com pressões específicas (*e.g.*, descargas de arrozais) que promovam o crescimento fitoplantónico ou que, de alguma forma, possam ser mais suscetíveis à acumulação de fitoplâncton (*e.g.*, braços de estuário com circulação de água reduzida), devem também ser amostrados, sempre que possível.

Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

Procedimento de amostragem

Método de amostragem de água

As recolhas para o elemento de qualidade biológica fitoplâncton executam-se nas mesmas estações e em simultâneo com os elementos químicos e físico-químicos de suporte aos biológicos. As colheitas com garrafa Niskin (horizontal) ou van Dorn (Figura 1) realizam-se a 0,5m de profundidade. Caso só seja possível amostrar uma maré, sugere-se a realização da colheita em preia-mar. No entanto, sempre que possível, a amostragem deve também ser realizada em baixa-mar. Em cada ponto de amostragem, deve-se começar por preencher as folhas de campo, garantindo que a todos os campos é atribuída a respetiva informação. O material de recolha deve ser lavado três vezes com água da amostra antes de ser efetuada a colheita. Deve-se garantir o correto uso de uma garrafa horizontal para a recolha das amostras, de modo a evitar a entrada de material em ressuspensão junto ao sedimento. A garrafa deve sempre ficar distante do substrato, sem nunca tocar o fundo antes das colheitas.

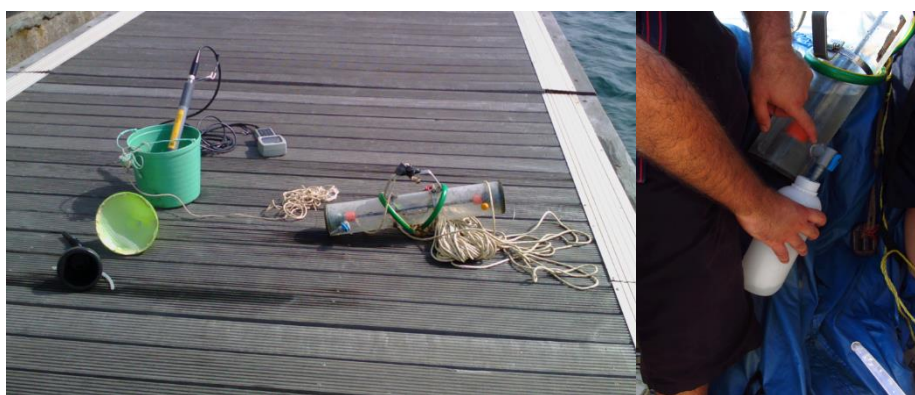


Figura 1 - Equipamento usado nas amostragens incluindo a garrafa van Dorn e momento de recolha de água.

Amostras de água por ponto de colheita

As amostras de água para clorofila-a devem ser colhidas à superfície (0,5m) e em triplicado: três garrafas de plástico (1,5-5L) devem ser utilizadas para a recolha, devidamente identificadas e guardadas em arca térmica, no escuro e frio. Deve-se ter em atenção que para o mar, ou em condições de preia-mar nas estações mais a jusante, i.e. quando a água está mais 'limpa', as amostragens devem considerar um volume mais elevado (até aos 5L) do que nas restantes condições.

Composição fitoplanctónica

Um frasco de 125mL de vidro âmbar onde se colocou previamente 1,5mL de solução de Lugol neutra (concentração final da amostra - 1%). Assim, a amostra de água deve ser introduzida sobre o preservante, com o copo graduado (100mL), sem nunca deixar verter, e depois guardada no escuro. Se se considerar preferível, o preservante pode ser adicionado no campo, após a recolha da amostra.

Variáveis ambientais

A amostragem do elemento de qualidade biológica fitoplâncton deve ser acompanhada da amostragem dos parâmetros físico-químicos, de modo a caracterizar a sua dinâmica. O parâmetro salinidade é obrigatório, uma vez que define em que classe de salinidade se está a trabalhar, elemento essencial para poder realizar a classificação do fitoplâncton. Recomenda-se, também, que sejam sempre recolhidas amostras para análise de nutrientes.

Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

Procedimento laboratorial

O processamento laboratorial inclui a determinação da concentração de clorofila-a, e ainda a identificação e a quantificação da composição fitoplanctónica.

Método para a determinação da clorofila-a

Filtração e armazenamento

Para quantificação da clorofila-a devem ser recolhidas amostras de água, em triplicado. O material de auxílio à medição (*e.g.*, proveta graduada) deverá ser lavado previamente com água da amostra. A amostra deve ser filtrada utilizando filtros GF/F de 47mm (com poro de 0,7 μ m). O filtro nunca deve ser deixado a seco durante a filtração, e a exposição à luz deve ser reduzida. A filtração deve ser realizada filtrando o máximo de volume possível (cerca de 1,5L-2L de água, no máximo), no entanto nunca excedendo os 30 minutos. Não se deve deixar colmatar o filtro. Deve-se registar sempre o volume filtrado para cada replicado. É preciso notar que, em sistemas estuarinos ou lagoas, é muito provável que seja necessário reduzir o volume a filtrar (*e.g.*, 0,25 – 0,75L).

Terminada a filtração, assim que o filtro ficar sem água, dobrar em quatro (com a amostra virada para o interior) e guardar em folha de alumínio ou em tubo de ensaio (10mL), corretamente identificado. Os filtros devem ser congelados de imediato, a -20°C por um período máximo de três semanas.

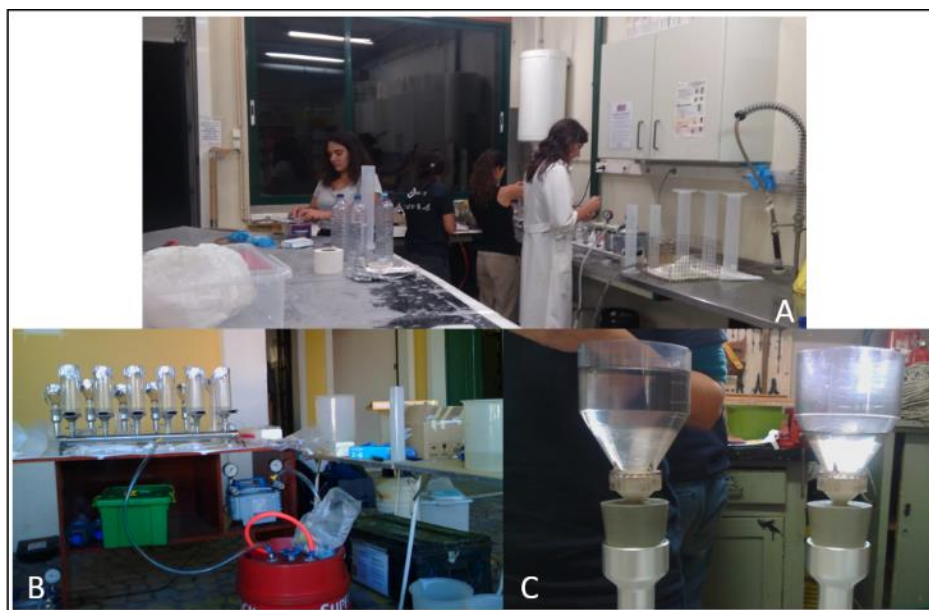


Figura 2 - Processamento laboratorial das amostras de águas: (A) vista geral da equipa a trabalhar; (B) sistema da rampa de filtração; (C) amostra a ser filtrada.

Processamento das amostras para quantificação da clorofila-a

O material específico para quantificação de clorofila-a (*e.g.*, tubos de ensaio) deverá ser previamente lavado utilizando um banho de Extran (1%) durante pelo menos 24 horas, sendo depois lavado três vezes com água destilada e posteriormente seco em estufa.

Num local fresco e escuro, retirar o filtro do alumínio em que foi conservado e colocá-lo num tubo de ensaio (ou manter caso tenha sido conservado desta forma). A amostra deverá ser sempre mantida em baixa luminosidade, embrulhando os tubos de ensaio em folha de alumínio. Macerar com 6mL (3mL + 3mL) de solução aquosa de acetona a 90% até não haver parcelas de filtro com grandes dimensões. Levar a amostra a um agitador de bancada (vortex) e de seguida proceder à sua conservação a -20°C. Passadas 24 horas, centrifugar a amostra a 4000rpm durante 15 min a 4°C e ler 1mL do sobrenadante num espectrofotómetro a

Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

664 e a 750nm, com célula de quartzo (ou alternativamente de vidro). Depois da leitura, adicionar 12µL de HCl a 0,5M, certificando-se que ocorreu a mistura adequada deste com a amostra, e repetir a leitura nos mesmos comprimentos de onda. A amostra deve ser lida contra um branco. Este é feito com solução aquosa de acetona a 90% (o solvente orgânico usado para extração da clorofila-a na amostra).

Nota: No caso de se obter um valor de absorvância superior a 0,005, aos 750nm, será necessário repetir a pipetagem e/ou a centrifugação do extrato, pois terá ocorrido ressuspensão do material sedimentado.

Quantificação das amostras

As concentrações de clorofila-a (Chl a) e feopigmentos são determinadas segundo as equações de Lorenzen (1967):

$$\text{Chl a } (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) = A \times K \times [(A_{664} - A_{750}) - (A_{664a} - A_{750a})] \times v / V_f$$
$$\text{pheo } (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}) = A \times K \times [R \times (A_{664a} - A_{750a}) - (A_{664} - A_{750})] \times v / (V_f \times I)$$

onde:

- A = coeficiente de absorção da clorofila-a = 11,0;
- K = fator destinado a restabelecer a concentração inicial em clorofila-a a partir da redução da absorvância = $R/(R-1) = 2,43$;
- A664 e A750 = valores de absorvância antes da acidificação da amostra;
- A664a e A750a = valores de absorvância depois da acidificação da amostra;
- v = volume de acetona usado para a extração (mL) = 6mL
- R = valor máximo da razão A664/A664a, na ausência de feopigmentos = 1,7 (experimentalmente, com clorofila-a pura);
- V_f = volume de água filtrado (L);
- I = passo ótico da *cuvette* = 1 cm.

Nota: Atenção que alguns destes coeficientes têm de ser calibrados nos equipamentos próprios.

Identificação e quantificação da composição fitoplanctónica

Para identificação e quantificação do fitoplâncton deve seguir-se o método de Utermöhl (1958), utilizando um microscópio invertido equipado com contraste de fase. Para tal deve ter-se como base a norma EN 15204:2006, de que se destacam os seguintes procedimentos:

- A homogeneização da amostra deverá ser realizada durante dois minutos com movimentos lentos de cambalhota e circulares horizontais, manualmente ou com agitadores apropriados;
- O volume de cada subamostra de água a sedimentar será dependente das concentrações de plâncton na amostra, da área da câmara de contagem e das quantidades de matéria em suspensão. Poderá ser entre 50-100mL de água em amostras de mar até poucos mililitros em águas com grandes concentrações em fitoplâncton;
- Os tempos de sedimentação variam com a altura da câmara e com o fixador utilizado. Para amostras fixadas com Lugol são aconselhados os tempos apresentados na Tabela I;
- No final da sedimentação deve deslizar-se a coluna e cobrir a câmara com vidro de forma a evitar a formação de bolhas de ar.

Tabela I - Tempos de sedimentação

Volume da câmara (mL)	Altura da câmara (cm)	Tempo de sedimentação (h)
2	1	3
10	2	8
25	5	12
50	10	24
100	20	48

A identificação taxonómica dos organismos fitoplanctónicos deve ser sempre que possível realizada até à espécie ou então, se não for possível, os indivíduos devem ser agrupados nos respetivos géneros, ou em categorias taxonómicas superiores. Como referência geral para nomenclatura das espécies pode seguir-se o

Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

trabalho de Moita & Vilarinho (1999), onde se encontra uma lista das espécies de fitoplâncton identificadas em águas costeiras e de transição de Portugal e onde estão referenciados os principais manuais de identificação taxonómica de fitoplâncton marinho e estuarino.

Tendo em conta que a estratégia e área de contagem a considerar depende especialmente da composição e densidade dos organismos fitoplanctónicos na amostra, a contagem das células fitoplanctónicas deve efetuar-se de acordo com os seguintes critérios:

- As células de maior dimensão serão contadas em toda a câmara ou em metade da câmara (varrimento de toda a câmara em transetos alternados), com uma ampliação de 200x, até se obter um número igual ou superior a 400 células (limite de confiança ~10 %);
- Os organismos de menor dimensão deverão ser contados com uma ampliação de 400x em 0,1-1ml da amostra, ou seja, em -número de campos de contagem ou transetos equivalentes a este volume sedimentado;
- Numa situação de elevada concentração de uma espécie, a contagem é feita a 200x, ou mesmo em 400x, em um ou mais diâmetros da câmara, ou em diversos campos, até que se obtenham pelo menos 50 células (limite de confiança ~28 %). A concentração de células na amostra será calculada em função do cálculo da área do transeto do diâmetro, ou do número de campos contados, relativamente à área total da câmara;
- Deverão contar-se sempre todas as células de cada colónia e não cada colónia como uma unidade;
- Não deverão ser contadas células partidas ou vazias. Poderão ser exceção a esta regra algumas células bastante compridas e/ou coloniais (e.g., *Rhizosolenia*, *Proboscia*) se tiverem cloroplastos pois podem facilmente partir-se com a homogeneização;
- Os resultados deverão ser apresentados em -número de células por litro (cel.L⁻¹) de acordo com a expressão:

$$N_{sp1} = X_{sp1} \times [A / (a \times v)]$$

em que:

- N = n.º de células da sp1 por unidade de volume (L);
- X = n.º de células totais contadas na câmara (ou por transeto, campo, etc.) da sp1;
- A = área total da câmara (cm²);
- a = área do campo ou de um transeto em que se efetuaram as contagens (cm²);
- v = volume de subamostra sedimentado na câmara (L).

Normas de segurança

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

Controlo de qualidade

A DQA exige que os métodos propostos para a avaliação do estado ecológico estejam de acordo com as normas existentes para o efeito, que as equipas e laboratórios que produzam resultados analíticos disponham de programas de controlo e garantia de qualidade (QA/QC) (NP EN ISO/IEC 17025:2018) e que participem regularmente em exercícios de intercalibração (*proficiency testing programmes*).

Garantia de qualidade durante a amostragem

As campanhas de amostragem devem ser programadas em função da geomorfologia de cada sistema, incluindo sempre a prévia inspeção 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 (e.g. de três em três anos), 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 aspetos 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 amostra;
- Seguir rigorosamente os procedimentos de amostragem definidos;
- Assegurar uma correta identificação dos frascos e garrafas;
- Acondicionar cuidadosamente as amostras, no escuro e no frio, antes de efetuar o seu transporte.

A ficha de campo deve ser preenchida no campo, e tem de estar completa no final de cada sessão de amostragem. De acordo com a frequência definida pelo laboratório e com os parâmetros de qualidade da amostragem, deverão ser efetuadas colheitas em triplicado para a avaliação da clorofila-a.

Garantia de qualidade em laboratório

O equipamento laboratorial deve ser inspecionado 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 efetuada por técnicos analistas, sem preparação específica para taxonomia de fitoplâncton. 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, devem participar em ensaios de intercalibração entre laboratórios.

O trabalho de identificação e contagem de fitoplâncton apenas pode ser efetuado por técnicos especializados e proficientes na matéria. 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 das espécies fitoplanctónicas que ocorrem em Portugal, criar coleções 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 efetuadas 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 efetuadas novas

Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

análises. Esse mesmo branco deverá ser processado como uma amostra de modo a despistar eventuais contaminações no material/equipamento utilizado.

Garantia de qualidade dos resultados

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

Bibliografia

Brito A.C., Boia A., Camarão B., Cardoso I., Cardoso I.*, Cereja R., Cruz J., Gamito S., Garcia C., Gonçalves J.M.S., Heumüller J., Pedro P., Rocha C., Silva G., Neto J.M. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. III – Fitoplâncton. APA/MONIPOR, 84p.

Anexos

Ficha de campo e de laboratório

Durante as amostragens, devem ser preenchidas as fichas de campo, que correspondem a folhas de registo com informações fundamentais para a interpretação e tratamento das amostras recolhidas.

Nestas fichas constam também informações essenciais que permitem uma correta identificação das amostras recolhidas, informações essas que devem ser transcritas para as etiquetas de identificação das amostras.

A correspondência entre a informação constante na ficha de campo e a identificação das amostras deve ser sempre correta e objetiva.

Folha de Registo de Saídas de Campo		
Projeto: _____	Amostradores: _____	Data / / _____
Hora da Maré: _____	Hora Amostragem: _____	Ponto de Amostragem: _____
Condições Meteorológicas*: _____	Orientação do vento: _____	
Temperatura do ar: _____ °C	Profundidade: _____	Profundidade de Secchi: _____ Lugar: <input type="checkbox"/>
<small>*registar a cobertura de nuvem em %, para além do estado meteorológico</small>		
Volumes Filtrados:		Notas/Observações:
	Filtro	Vol. Filtr. (L)
TSM 1	GF/F	_____
TSM 2	47mm	_____
TSM 3	muflado	_____
CHL 1	GF/F	_____
CHL 2	47mm	_____
CHL 3		_____

Elemento Biológico – Fitoplâncton

Águas de Transição e Costeiras

Sonda Multiparametrica

Prof.(m)	pH	Sal.	OD (mg/L)	%OD	T (°C)			

Figura 3 - Exemplo de ficha de campo para o elemento biológico fitoplâncton

MACROALGAS (Oportunistas)



Elemento Biológico – Macroalgas (oportunistas) Águas de Transição e Costeiras

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

O presente protocolo procura, no âmbito da DQA, sistematizar medidas orientadoras dos procedimentos de amostragem e análise do elemento de qualidade biológica macroalgas oportunistas em águas de transição e lagoas costeiras, com vista à classificação do seu estado ecológico. São referidos os procedimentos de amostragem e de laboratório, de modo a garantir a recolha de nova informação que garanta a comparabilidade dos resultados entre as diferentes amostragens e que possa expressar uma classificação ecológica de acordo com o estado de qualidade apresentado pelas massas de água em estudo.

A monitorização e classificação da massa de água, nos termos da DQA, pressupõe o correto planeamento e cumprimento rigoroso do protocolo de amostragem e processamento laboratorial estabelecido.

Aplicabilidade

Este protocolo aplica-se a todas as tipologias de massas de água de transição e costeira, suscetíveis ao desenvolvimento de áreas propícias ao crescimento e acumulação de macroalgas oportunistas (e.g., Ulváceas) que, potenciadas pelo reduzido hidrodinamismo, disponibilidade de substrato adequado à sua fixação ou acumulação, e pelos níveis elevados de nutrientes, aí apresentem uma ocorrência fora do padrão natural.

Os procedimentos de avaliação, pelos índices que fazem parte da ferramenta desenvolvida, deverão ser capazes de detetar desvios nas condições ecológicas do elemento biológico, nomeadamente pelos parâmetros relativos à abundância das macroalgas oportunistas. Este processo tem como base os dados recolhidos no campo que, através dos desvios apresentados relativamente às condições de referência definidas para o elemento, resultará na classificação da qualidade ecológica apresentada pelas massas de água em estudo.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

A DQA determina que a monitorização das macroalgas seja efetuada de três em três anos. No entanto, como forma de conseguir um seguimento mais próximo e eficaz, o trabalho de campo deve ser efetuado anualmente, fazendo depois a classificação com base na média aritmética dos resultados obtidos para o período em estudo.

No que se refere à época de amostragem, dependendo das zonas a amostrar, poderá ser necessário realizar campanhas (em baixa-mar) na primavera e no início do verão, entre abril e junho (Patrício *et al.*, 2007), de forma a capturar os efeitos da época de crescimento destes organismos (Scanlan *et al.*, 2007).

Material e equipamento

O material necessário à operação de recolha de dados no campo deverá ser organizado antes da deslocação, atendendo à seguinte lista:

- Fichas de campo e prancheta de plástico ou madeira;
- Lápis e marcador;
- GPS;
- Máquina fotográfica;
- Botas de borracha;
- Sacos de plástico etiquetados para recolha de amostras biológicas;
- Tubo de amostragem para recolha de amostras biológicas (se necessário para biomassa);
- Contentor de plástico para transporte de material e de amostras;
- Arcas térmicas para transporte de amostras para o laboratório;

Elemento Biológico – Macroalgas (oportunistas)

Águas de Transição e Costeiras

- Roupas adequadas ao trabalho de campo;
- Luvas descartáveis;
- Chapéu e protetor solar.

Seleção dos locais de amostragem

Os locais de amostragem deverão ser definidos antes da ida para o campo, dentro da área intermareal arenoso-vasoso dos sistemas de transição e lagunares costeiras onde, devido a proliferação ou acumulação, as macroalgas oportunistas possam apresentar com frequência uma biomassa ou uma área de cobertura expressivas e pouco características do local. Devem ser acessíveis de forma segura, por terra ou de barco.

Procedimento de Amostragem

De uma forma geral, as diferentes metodologias usadas na monitorização de macroalgas oportunistas baseiam-se na recolha de dados relativos a um número restrito de *taxa*.

Embora estas espécies estejam naturalmente presentes nos sistemas a monitorizar, em situações de enriquecimento orgânico estas podem proliferar de forma descontrolada e trazer prejuízos avultados às restantes comunidades. Esta abundância pode ser quantificada, habitualmente, por intermédio da cobertura ou da biomassa apresentada nestes momentos de exacerbada multiplicação. O período de amostragem recomendado compreende-se entre abril e junho (Patrício *et al.*, 2007).

Mais do que haver um tipo específico de metodologia de amostragem, será sensato perceber que instrumentos estão à disposição e permitem a realização desta tarefa, bem como dos custos envolvidos face às características do sistema a monitorizar. Podem ir desde as técnicas convencionais de recolha direta de dados no campo, usando um GPS de mão para registo dos polígonos ocupados pelos mantos de macroalgas oportunistas, até às de quantificação remota, com recurso à análise e interpretação dos dados disponibilizados por imagens de satélite ou outro meio que permita a recolha de imagens aéreas verticais. Aconselha-se, de qualquer das formas, uma verificação e validação no terreno dos resultados obtidos por via das técnicas de análise de imagens obtidas remotamente.

As metodologias desenvolvidas baseiam-se na determinação de dois parâmetros característicos das macroalgas oportunistas:

- Composição taxonómica;
- Uma medida da abundância de macroalgas oportunistas - i.e., densidade, percentagem de cobertura, biomassa.

Assim, a amostragem corresponde à primeira fase do processo de avaliação. O procedimento geral passa, inicialmente e em cada massa de água, pela localização das manchas de vegetação que correspondam a este elemento, bem como a identificação e aferição da facilidade de acesso a essas manchas de vegetação presente no intermareal dos sistemas de transição e costeiras. Uma vez no terreno, serão recolhidos os dados necessários à aplicação das métricas que fazem parte da ferramenta de avaliação, como em seguida se especifica:

Composição taxonómica

O observador identifica e regista as espécies de macroalgas presentes no local, certificando-se que correspondem às macroalgas catalogadas como oportunistas e que de forma mais explícita respondem ao aumento da concentração de nutrientes no sistema, com o aumento da sua biomassa (Ulváceas);

Área coberta

Relativamente à quantificação da área coberta por macroalgas oportunistas (ha), o observador deverá identificar a área total que apresenta manchas de macroalgas oportunistas na superfície do sedimento. Dentro desta área, deverão ser registadas as áreas parciais que apresentem diferentes densidades de macroalgas oportunistas (*e.g.*, 1-25%, 26-50%, 51-75%, 76-100% da superfície do sedimento disponível). De uma forma prática, são identificadas as áreas cobertas, independentemente da densidade que apresentem (biomassa por unidade de área). Percorre-se o perímetro de cada uma das subáreas com diferentes

Elemento Biológico – Macroalgas (oportunistas)

Águas de Transição e Costeiras

densidades de cobertura de macroalgas oportunistas (1-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100%). A determinação da área coberta faz-se recorrendo a um aparelho de GPS ou a imagens de satélite validadas no terreno.

É de esperar que as maiores biomassas apareçam em áreas com cobertura mais próxima de 100%, onde várias camadas de macroalgas se depositam umas sobre as outras. Pelo seu dinamismo natural, estas manchas de macroalgas oportunistas podem desaparecer repentinamente nos dias mais quentes de verão que, após o consumo total do oxigénio da coluna de água, acabam por morrer e provocar a morte de grande parte da comunidade bentónica.

Devem, igualmente, ser registadas as espécies exóticas que apareçam nos sistemas a monitorizar, bem como a área que ocupam.

Processamento das amostras no campo

Não sendo necessário proceder à recolha de qualquer amostra biológica para processamento laboratorial, o trabalho de campo restringe-se à recolha de informação das posições geográficas das manchas de macroalgas oportunistas.

Procedimento laboratorial

Só exceionalmente poderá haver recolha no campo de algum material biológico. Toda a restante informação será recolhida com o auxílio de um aparelho GPS, máquina fotográfica e folha de registo de campo, pelo que, de igual forma, também não haverá lugar a qualquer processamento de amostras biológicas no laboratório.

Normas de segurança

O ambiente intermareal estuarino pode ser perigoso, nomeadamente pelo tipo de substrato pouco consolidado e escorregadio que apresenta e pela constante subida e descida das marés, pelo que se deverá ter uma atenção contínua ao estado do mar.

O substrato vasoso, ao contrário do sedimento mais arenoso, é o que normalmente apresenta maiores dificuldades à deslocação das pessoas, principalmente às que têm pouco contacto com este tipo de ambientes. Por esta razão, é aconselhável que as tarefas a realizar neste tipo de locais sejam realizadas pelo menos por duas pessoas, sendo que uma delas deve apresentar alguma experiência de trabalho neste tipo de ambientes.

O caminhar deve ser feito com passos curtos, a velocidade constante, tentando parar o menor tempo possível em locais que apresentem um substrato muito macio. Ao retomar a marcha, deve-se ter o cuidado de deixar os dois pés disponíveis para andar, sob risco de cair de frente no sedimento por não ter os pés livres a tempo de realizar o passo em frente. Deverá soltar um pé e só depois dar o primeiro passo. O calçado deverá conferir uma boa adesão ao piso e corresponder a um número justo ao pé, para que a bota não tenha facilidade em sair pela ação de sucção do sedimento mais vasoso.

As roupas devem ser adequadas às condições climáticas, que permitam simultaneamente proteção e impermeabilidade. Recomenda-se também o uso de chapéu e de protetor solar (rosto e braços).

Controlo de qualidade

A DQA exige que os métodos propostos para a avaliação do estado ecológico estejam de acordo com as boas práticas de amostragem e que cumpram os critérios submetidos a avaliação durante o exercício de intercalibração, de forma que a recolha e o tratamento de dados sejam feitos em concordância com os processos acordados no âmbito da estratégia comum de implementação da DQA. Assim, os métodos de recolha e tratamento de dados deverão seguir os definidos no âmbito do exercício, descritos neste protocolo.

A amostragem deve ser realizada por pessoal especializado, familiarizado com o tipo de organismos em causa e que participe regularmente em exercícios de atualização de conhecimentos.

Elemento Biológico – Macroalgas (oportunistas)

Águas de Transição e Costeiras

Bibliografia

Neto J.M., Melo R., Mace R., Martins M., Mendes R.N., Pacheco D., Parreira F., Santos R., Silva J. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. IV – Macroalgas Oportunistas. APA/MONIPOR, 43p.

Patrício, J., Neto, J.M., Teixeira, H., Marques, J.C. (2007). Opportunistic macroalgae metrics for transitional waters. Testing tools to assess ecological quality status in Portugal. Marine Pollution Bulletin 54: 1887-1896.

Scanlan, C. M., Foden, J., Wells, E. and Best, M. A. (2007). The monitoring of opportunistic macroalgal blooms for the water framework directive. Marine Pollution Bulletin 55 (1–6): 162-171.

Anexos

Ficha de campo e de laboratório

A Figura 1 representa a ficha de campo a usar para registar os dados no momento da amostragem das macroalgas oportunistas. Parte da informação já poderá vir pré-preenchida do laboratório, nomeadamente o sistema, o código do local, etc., de forma a não demorar desnecessariamente o trabalho no campo.

As fichas devem ser preenchidas de forma completa, ainda no campo ou à chegada ao laboratório. Sempre que seja possível, deverá ser feito um esquema da implantação das manchas de macroalgas oportunistas no sistema, de modo a auxiliar futuras prospeções ou a tirar dúvidas que surjam posteriormente no laboratório.

Deverá estabelecer-se um código (*e.g.*, A, B, C, ...) que relacione as manchas desenhadas na parte inferior da ficha com as percentagens (*e.g.*, <25 %, <50 %, ...) apresentada por cada espécie (*e.g.*, Ulváceas) nas linhas correspondentes a cada mancha inspecionada (*e.g.*, 1, 2, ...).

FOLHA DE CAMPO (Macroalgas Oportunistas)													
Sistema:		Responsável:		Ponto de Acesso (se for terra)		OBS:							
Massa de água:		Instituição:		Lat (N):									
Local:		Equipa:		Long (W):									
Data:				Cond. Climatéricas:									
Hora início:													
Hora fim:		Substrato: Arenoso		Vasoso									
Mancha	Coord. WGS84	Ulváceas											
1	Lat (N): Long (W):	<25%	<50%	<75%	<100%	<25%	<50%	<75%	<100%	<25%	<50%	<75%	<100%
2	Lat (N): Long (W):												
3	Lat (N): Long (W):												
4	Lat (N): Long (W):												
5	Lat (N): Long (W):												
<div style="display: flex;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg); font-size: small; margin-right: 5px;">Esquema das manchas de Macroalgas Oportunistas</div> <div style="border: 1px solid black; flex-grow: 1;"></div> </div>													

Figura 1 – Exemplo de ficha de campo para o elemento biológico macroalgas oportunistas.

MACROALGAS (Substrato Rochoso)



Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso) Águas Costeiras

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

O presente protocolo procura sistematizar medidas orientadoras dos procedimentos de amostragem e análise das macroalgas de substrato rochoso em águas costeiras, com vista à classificação do seu estado ecológico.

A monitorização e classificação da massa de água, nos termos da DQA, pressupõe o correto planeamento e cumprimento rigoroso do protocolo de amostragem e processamento laboratorial estabelecido.

Aplicabilidade

Este protocolo aplica-se às tipologias de águas costeiras onde ocorram praias em que a presença de substrato rochoso apresente os três horizontes do patamar médio litoral colonizado por comunidades de macroalgas.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

A DQA determina que a monitorização das macroalgas em águas costeiras seja efetuada de três em três anos. As colheitas devem realizar-se em baixa-mar de marés vivas, durante o verão, entre junho e setembro.

Material e equipamento

O material necessário à operação de recolha de dados no campo deverá ser organizado antes da deslocação, atendendo à seguinte lista:

- Prancheta com fotocópias dos protocolos de amostragem e lápis;
- Grelha metálica ou plástica com área de 0,20 x 0,20m (subdividida em quadrículas 0,05 x 0,05m);
- Grelha metálica ou plástica com área de 0,50 x 0,50m;
- Sacos plásticos com fecho ZIP, etiquetas de papel vegetal, lápis e caneta de acetato, formão/faca;
- Fita métrica (e.g. 50 metros);
- Máquina fotográfica à prova de água;
- Aparelho de GPS;
- Arca térmica e placas de gelo.

Seleção dos locais de amostragem

Os locais de amostragem distribuem-se pelas praias que possuem afloramentos rochosos horizontais ou de declive pouco acentuado, que fiquem expostos durante a maré baixa, que apresentem os três horizontes (superior, médio e inferior) do patamar médio litoral, e que sejam representativos das comunidades macroalgais da massa de água a amostrar.

Procedimento de Amostragem

Atendendo às características da praia a amostrar, pode optar-se pelo Protocolo A ou pelo Protocolo B, sendo que os resultados da aplicação destes dois protocolos deverão ser equivalentes em termos de classificação das massas de água.

Protocolo A

O método de amostragem envolve a realização de transetos dispostos de forma representativa da diversidade e características da área a amostrar. Em cada massa de água devem ser instalados três transetos, podendo, no entanto, ser adaptado o seu número à extensão e diversidade do substrato rochoso. São dispostos em praias que possuam plataformas rochosas de declive variável (essenciais à fixação e crescimento das espécies)

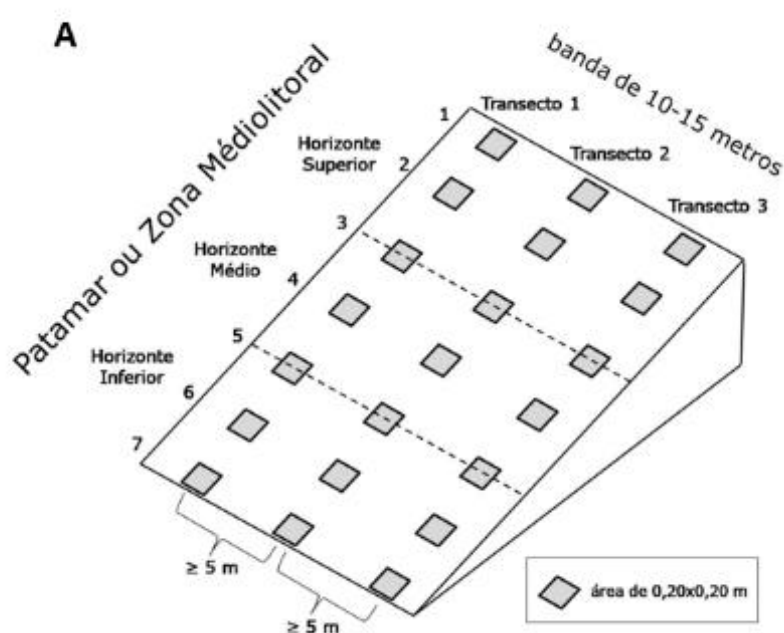
Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

e que fiquem expostas na baixa-mar (existência de substrato rochoso na zona entre marés). O procedimento geral passa pela marcação de três transectos perpendiculares à linha de costa (dentro de uma banda de 10-15m de largura) sobre as plataformas rochosas (Figura 1), que apresentem sempre os três níveis ecológicos descritos para estes locais (superior, intermédio e inferior), e que sejam representativos das comunidades macroalgais presentes na massa de água. Têm, para isso, de ser posicionados de forma a sobrepor-se aos povoamentos mais característicos encontrados no local de amostragem. Os transectos são percorridos a pé por um técnico experiente que identifica as espécies presentes (composição taxonómica) e determina a cobertura das espécies consideradas oportunistas (abundância). Neste trajeto, o técnico deverá registar, também, a ocorrência de todas as espécies exóticas presentes, bem como a sua cobertura. O método seguido é tendencialmente não destrutivo, sendo feita a identificação das espécies no local e a determinação da cobertura recorrendo a um efetivo registo fotográfico e a uma avaliação, também no momento, das coberturas das espécies alvo. No entanto, sempre que se achar necessário, serão recolhidos organismos para confirmação em laboratório da sua correta taxonomia.

A amostragem inclui 3 tipos de registos: i) COMPOSIÇÃO; ii) ABUNDÂNCIA; e iii) DESCRIÇÃO DO LOCAL DE AMOSTRAGEM. Os registos de COMPOSIÇÃO e de ABUNDÂNCIA são elementos essenciais no âmbito da DQA.

O registo da DESCRIÇÃO DO LOCAL DE AMOSTRAGEM tem como objetivo poder ser usado como um fator de correção, que permita comparar locais com diferentes riquezas específicas resultantes da presença de condições geomorfológicas distintas (Wells *et al.*, 2007).



Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso) Águas Costeiras

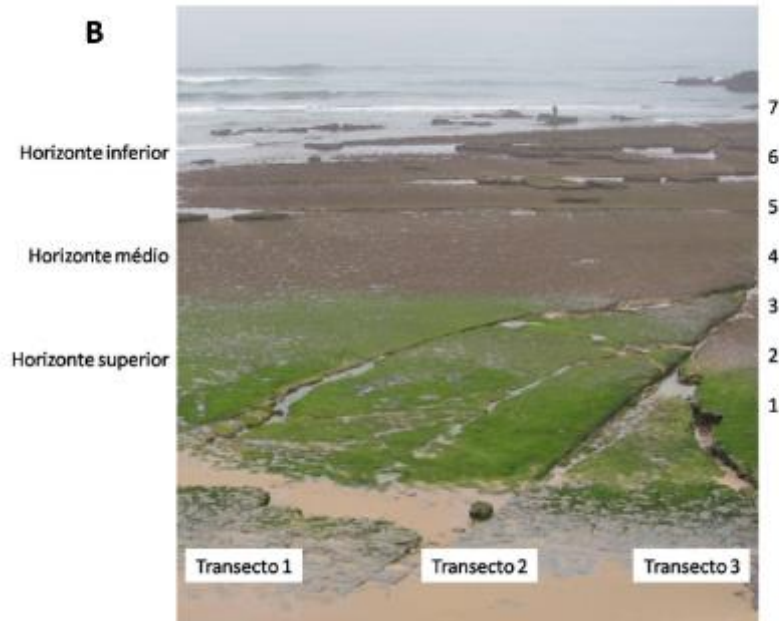


Figura 1 - Localização relativa no médio litoral das áreas de 0,20x 0,20m a serem fotografadas (A). Fotografia do patamar médio litoral a amostrar, localização dos transectos e dos níveis onde se dispõem as fotografias a fazer de cada horizonte (B).

1) Registo da composição taxonómica (Tabela I): percorrendo a pé a área de amostragem (banda de 10-15m), faz-se o registo visual da presença de *taxa*, ao nível taxonómico mais baixo possível (se possível até à espécie) e de forma a cumprir os critérios mínimos considerados na “Reduced Taxa List” - RTL (Neto *et al.*, 2012). Deve-se assinalar as observações de cada espécie encontrada, especificando na coluna “PRESENÇA” da Tabela I se a observação foi feita em “Substrato Emergente” (SE) ou em “Poça de Maré”(PM). Outras espécies que sejam encontradas poderão ser acrescentadas à RTL, sendo obrigatório fazê-lo no caso das Espécies Exóticas (EE), por constituir um registo histórico importante. Embora possa não ser necessário para a avaliação de qualidade, deverá ser especificada a máxima informação taxonómica possível sobre cada observação (por exemplo, referir que se trata da *Carpodesmia tamariscifolia* na entrada *Cystoseira / Carpodesmia / Treptacantha* spp., referir que se trata de *Gelidium pulchellum* na entrada Gelidiales, etc.).

2) Registo de abundância (Tabela I e Figura 1): a abundância é um parâmetro essencial no cálculo da qualidade ecológica, pelo que a sua determinação deve ser cuidada, mas ao mesmo tempo, não representar uma tarefa demasiado morosa. Além das espécies constituintes da flora portuguesa, serão também tidas em conta as espécies exóticas que, por defeito e de modo precaucionário, serão todas consideradas potencialmente invasoras e, desse modo, consideradas como detentoras de um comportamento semelhante ao das nativas oportunistas (Tabela I). A cobertura das espécies exóticas deverá ser sempre avaliada, à semelhança do que se faz com as espécies consideradas oportunistas.

Apresentam-se aqui duas formas possíveis para fazer a avaliação da cobertura de oportunistas e espécies exóticas:

a) Com vista a reduzir o impacto causado pela amostragem, estas são tendencialmente não destrutivas. Nesse sentido é usado o registo fotográfico digital (para o posterior cálculo da cobertura de espécies oportunistas e de espécies exóticas) de áreas de 0,20 x 0,20m, dentro da banda de amostragem. São definidos três transectos perpendiculares à linha de costa, ao longo de cada um dos quais são fotografadas sete réplicas sendo que cada réplica representa um nível diferente do médio litoral (Figura 1). As réplicas 2, 4 e 6 posicionam-se tipicamente nos horizontes superior, médio e inferior, respetivamente, e as réplicas 1, 3, 5 e 7 posicionam-se nos níveis intermédios das réplicas anteriores, i.e., acima ou abaixo das réplicas 2, 4 e 6. Desta forma: três transectos = três réplicas por nível x sete níveis do médio litoral (Total: 21 réplicas) (Figura 1). Cada fotografia

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso) Águas Costeiras

deve identificar cada uma das réplicas. Por exemplo, denominar as réplicas da seguinte forma (e, antes de cada fotografia, fotografar o nome de cada réplica - ver abaixo), onde T = Transeto e R = Réplica (Tabela II).

Tabela II – Exemplo de etiquetas a produzir para identificar cada uma das réplicas a fotografar no substrato rochoso.

	Transeto 1	Transeto 2	Transeto 3
Nível 1	T1R1	T2R1	T3R1
Nível 2	T1R2	T2R2	T3R2
Nível 3	T1R3	T2R3	T3R3
Nível 4	T1R4	T2R4	T3R4
Nível 5	T1R5	T2R5	T3R5
Nível 6	T1R6	T2R6	T3R6
Nível 7	T1R7	T2R7	T3R7

A área de 0,20 x 0,20m (réplica) deve estar subdividida em subáreas de 0,05 x 0,05m, i.e., apresenta 16 subdivisões (Figura 3).



Figura 3 - Área de 0,20 x 0,20 m (réplica) subdividida em 16 subáreas de 0,05 x 0,05 m.

A cobertura de espécies de macroalgas oportunistas (CO) é expressa em percentagem (%) (ver os *taxa* incluídos na RTL e assinalados como oportunistas). Considera-se que todas as espécies presentes (oportunistas ou não) correspondem a 100% de cobertura. As réplicas deverão ser semi-aleatórias, colocadas em locais onde as macroalgas (oportunistas ou não) dominem a cobertura, evitando a rocha nua, i.e., sem macroalgas. No entanto, para os cálculos de CO, contabilizam-se também as áreas sem macroalgas que surjam dentro dos quadrados de amostragem.

Cada réplica fotografada será analisada usando a seguinte fórmula:

$$CO (\%) = QCO \times 100 / (16 - EQ)$$

- QCO corresponde ao número de subáreas de 0,05 x 0,05m com macroalgas oportunistas;
- EQ corresponde ao número de subáreas de 0,05 x 0,05m vazias (sem macroalgas, i.e. rocha nua/areia/outros organismos que não macroalgas).

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

Usa-se uma resolução de $\frac{1}{4}$ de cada subárea de $0,05 \times 0,05\text{m}$ para os cálculos, i.e. $0,0025\text{m}^2$. Por exemplo, a réplica da Figura 3 apresenta cerca de 3,5 subáreas de $0,05 \times 0,05\text{m}$ vazias (rocha nua/areia) e cerca de 10 subáreas de $0,05 \times 0,05\text{m}$ ocupadas por uma cobertura de macroalgas oportunistas (neste caso de *Ulva* spp.), pelo que aplicando a equação se obtém cerca de 80% de CO, conforme demonstrado abaixo:

$$\text{CO (\%)} = 10 \times 100 / (16 - 3,5) = 80\%$$

Posteriormente, a CO será calculada como a média aritmética de todas as 21 réplicas de um dado local.

b) O registo visual da cobertura de oportunistas e espécies exóticas pode ser, no entanto, efetuado de uma forma mais rápida e expedita do que o processo mostrado anteriormente. Será necessário algum treino e aconselha-se que sejam aferidas as estimativas entre pelo menos dois técnicos, de forma a reduzir o erro que um só observador possa impor aos resultados decorrentes da avaliação. O registo visual DAFOR (Abaye *et al.*, 1997) das espécies oportunistas e das espécies exóticas, relativamente à área coberta por macroalgas dentro da banda de 10-15m, resulta da determinação direta da área ocupada por oportunistas e espécies exóticas dentro da área total coberta por macroalgas. Deve também registar-se fotograficamente o aspeto geral da comunidade.

Quantificação DAFOR (% de cobertura):

- D: Dominante 50-100%
- A: Abundante 30-50%
- F: Frequente 15-30%
- O: Ocasional 5-15%
- R: Raro < 5%
- N: Não observado

Nota: Em caso de dúvida, e estando a avaliação da cobertura de uma espécie entre duas categorias da escala DAFOR, escolhe-se a categoria inferior. Por exemplo, se houver dúvida entre as categorias ocasional e frequente, escolhe-se a categoria ocasional.

3) Registo da descrição do local de amostragem (Tabela III). Para cada praia deve ainda ser preenchida a Tabela III com a descrição visual do local de amostragem. O correto preenchimento desta tabela é fundamental para a aplicação do índice de qualidade e resultante classificação do estado ecológico. A identificação dos locais de amostragem deve ser feita de forma clara, preenchendo as INFORMAÇÕES GERAIS, presentes no cabeçalho da folha de campo, com todos os dados solicitados.

Relativamente à DESCRIÇÃO DA COSTA, note-se que em termos geomorfológicos se considera que de uma forma geral toda a plataforma continental do litoral português é dominada por erosão ou acumulação (Pereira *et al.*, 2005) e onde as costas de cré estão ausentes. Assim, aquando o preenchimento da DESCRIÇÃO DA COSTA deve optar-se sempre (isto é, para qualquer local da costa continental portuguesa) por descrever o campo (1) Presença de Turbidez (conhecida como sendo não antropogénica) através da opção “Sim = 0”, o campo (2) Abrasão por areia através da opção “Sim = 0”, e o campo (3) costa de cré através da opção “Não = 2”. O somatório de pontuações resulta do somatório dos valores resultantes dos descritores (1) “presença de turbidez”, (2) “abrasão por areia” e (3) “costa de cré”, com os valores resultantes do valor mais alto do descritor (4) “tipo de costa dominante” (selecionar apenas uma opção), do valor mais alto do descritor (5) “sub-habitats” (selecionar a pontuação mais alta das opções marcadas) e do valor do descritor (6) “número total de sub-habitats” (contar o número de opções selecionadas anteriormente no descritor “sub-habitats”). O valor final da métrica “descrição da costa” resulta do somatório das pontuações desses campos, sendo de salientar que os campos “biota dominante” e “comentários” são informações extra que não entram para os cálculos.

Relativamente ao descritor (4) “tipo de costa dominante”, seleciona-se apenas uma opção. A seleção da opção “Cumes rochosos/afloramentos/plataformas” pontua como 4, a seleção da opção “Rocha irregular” ou da opção “Pedregulhos grandes, médios e pequenos” pontua como 3, a seleção da opção “Rocha íngreme/vertical” ou da opção “Substrato duro não específico” pontua como 2, a seleção da opção

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso) Águas Costeiras

“Seixos/pedras/rochas pequenas” pontua como 1 e a seleção da opção “Cascalho” pontua como 0 (Figuras 4 a 6).



Figura 4 – Costa rochosa, plataforma intermareal com bacias rochosas comuns e fendas grandes.



Figura 5 – Costa rochosa com pedregulhos grandes, médios e pequenos.

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso) Águas Costeiras



Figura 6 – Costa com substrato de rocha irregular (rodeada por areia).

Relativamente ao descritor (5) “Sub-habitats” seleciona-se uma ou mais opções. No entanto, para efeitos de cálculo deve considerar-se apenas a pontuação mais alta das opções marcadas. A seleção da opção “Bacias rochosas largas e pouco profundas (>3 m de largura e <50 cm de profundidade)”, da opção “Bacias rochosas grandes (>6 m de comprimento)” ou da opção “Bacias rochosas profundas (50% >100 cm de profundidade)” pontua como 4, a seleção da opção “Bacias rochosas comuns” ou da opção “Fendas grandes” pontua como 3, a seleção da opção “Grandes saliências e rocha vertical” ou da opção “Outros habitats (deve especificar-se que tipo, e.g.: pedregulhos grandes e médios)” pontua como 2, a seleção da opção “Cavernas” pontua como 1 e a seleção da opção “Nenhum” pontua como 0. Relativamente ao descritor (6) “Número total de sub-habitats”, contam-se o número de opções selecionadas anteriormente no descritor (5) Sub-habitats. Por exemplo, a seleção de 3 sub-habitats pontua como 3 e a seleção de 4 ou mais sub-habitats pontua como 4.

O Resumo corresponde ao último passo de condensação dos valores atribuídos aos diferentes descritores durante o processo de descrição da costa. Devem ser copiados os valores de cada descritor e calculado o resultado final a atribuir a esta métrica. Este é o valor a considerar pelo p-MarMAT no momento do cálculo do EQR (Rácio de Qualidade Ecológica) de cada praia.

Deve também registar-se fotograficamente o aspeto geral das comunidades.

Protocolo B

Em cada praia (local) a amostrar devem ser escolhidos três sítios de amostragem (três áreas rochosas separadas entre si por cerca de 100m). Os sítios a amostrar devem apresentar uma zona intermareal representativa (sendo necessário a existência de um substrato rochoso adequado ao desenvolvimento de comunidades de macroalgas). Em cada sítio devem ser instalados três transetos com dez metros de extensão, georreferenciados para futura localização, dispostos paralelamente entre si e à linha de costa, localizados nos diferentes níveis representativos da zonação intermareal (Figuras 7 a 11).

Estes níveis foram estabelecidos a priori seguindo os seguintes princípios orientadores:

- Horizonte superior, corresponde à zona mais superior do patamar médio litoral, instalando-se o referido transeto na banda ocupada por *Fucus spiralis*;
- Horizonte médio, corresponde a uma banda compreendida entre o horizonte superior e o inferior, colocando-se um segundo transeto na banda correspondente ao limite inferior da espécie *Lithophylum tortuosum*;

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

- Horizonte inferior, corresponde à banda mais inferior do patamar médio litoral, instalando-se o transecto na área mais inferior possível do litoral (devendo ser acessível em todas as marés vivas). (Figura 7).

À semelhança do protocolo A, esta amostragem também inclui três tipos de registos (COMPOSIÇÃO, ABUNDÂNCIA e DESCRIÇÃO DO LOCAL DE AMOSTRAGEM).

3) Registo da composição taxonómica (Tabela I): ao longo de cada transecto devem ser marcados três quadrados de 0,20 x 0,20m, localizados com recurso a tabelas de números aleatórios, mas evitando-se, no entanto, as poças de maré. Depois de definidos, os quadrados são fotografados e o seu interior raspado integralmente, para posterior triagem em laboratório. Os quadrados de 0,20 x 0,20m devem ser fotografados uma segunda vez, depois de raspados, para avaliação da cobertura por algas incrustantes. O material biológico recolhido por raspagem deve ser transportado para o laboratório em sacos de plástico devidamente identificados e etiquetados, e acondicionado refrigerado em arcas térmicas.

Uma vez no laboratório, o material recolhido deve ser cuidadosamente limpo e armazenado em frascos com solução “Kew”, ficando disponível para eventuais confirmações ou esclarecimento de dúvidas surgidas posteriormente durante o processamento das amostras. A solução de “Kew” (“Kew mix”) contém 53% álcool metilado industrial (etanol, 98/99%), 37% água, 5% formaldeído (38%) e 5% glicerol. O formaldeído atua como fixador, o álcool como conservante e o glicerol ajuda a impedir que os espécimes se tornem quebradiços.

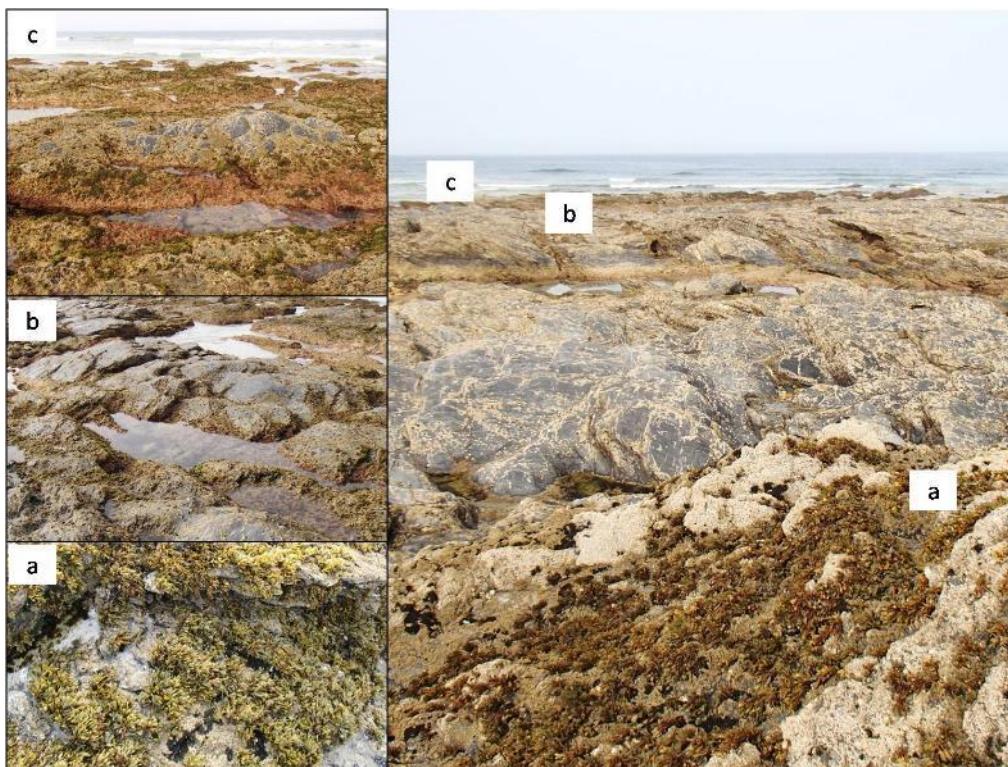


Figura 7 – Horizontes e vegetação associados característicos da costa rochosa: a) horizonte superior - *Fucus spiralis*; b) horizonte médio - *Lithophyllum tortuosum*; c) horizonte inferior.

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

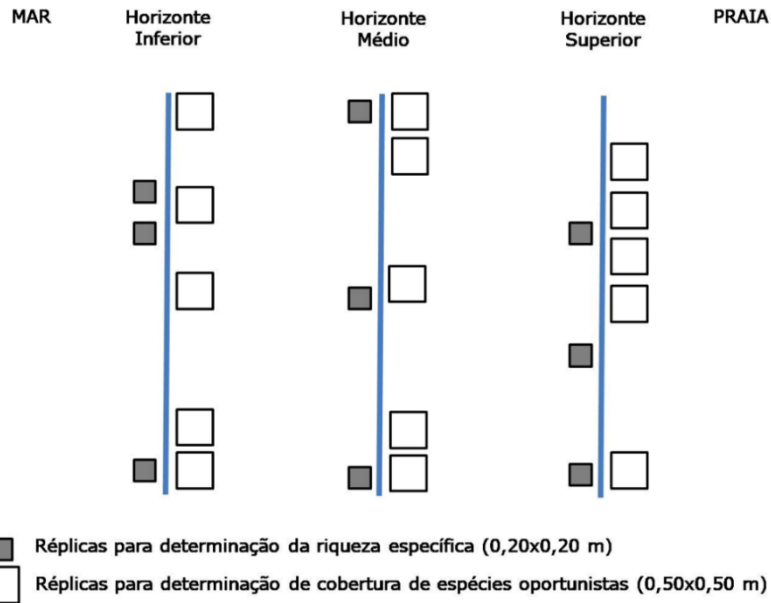


Figura 8 – Representação gráfica do delineamento experimental seguido em cada sítio para amostragem de macroalgas em plataformas rochosas intermareais (Protocolo B).



Figura 9 – Aspecto da colocação de um transecto (Protocolo B).

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso) Águas Costeiras



Figura 10 – Geolocalização de um transeto de amostragem (ponto inicial/final).



Figura 11 – Material biológico recolhido por raspagem do quadrado de 0,20 x 0,20 m.

2) Registo de abundância: ao longo de cada transeto devem ser fotografados cinco quadrados de 0,50 x 0,50m, selecionados aleatoriamente (como descrito anteriormente), para determinação da cobertura de espécies oportunistas. Os quadrados para determinação da abundância de oportunistas devem localizar-se no lado oposto do transeto relativamente aos quadrados de 0,20 x 0,20m. As fotografias devem ser alvo de tratamento de imagem para determinação das coberturas apresentadas pelas espécies oportunistas, de acordo com o método dos 49 pontos de interceção, que distribui de forma equidistante 49 pontos num quadrado e onde cada interceção com os *taxa* oportunistas corresponde a 2,040816% de cobertura (uma vez que 49 pontos intercetados com oportunistas corresponde a 100% de cobertura de oportunistas, i.e., $49 \times 2,040816 = 100\%$) (Figura 12).

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso) Águas Costeiras

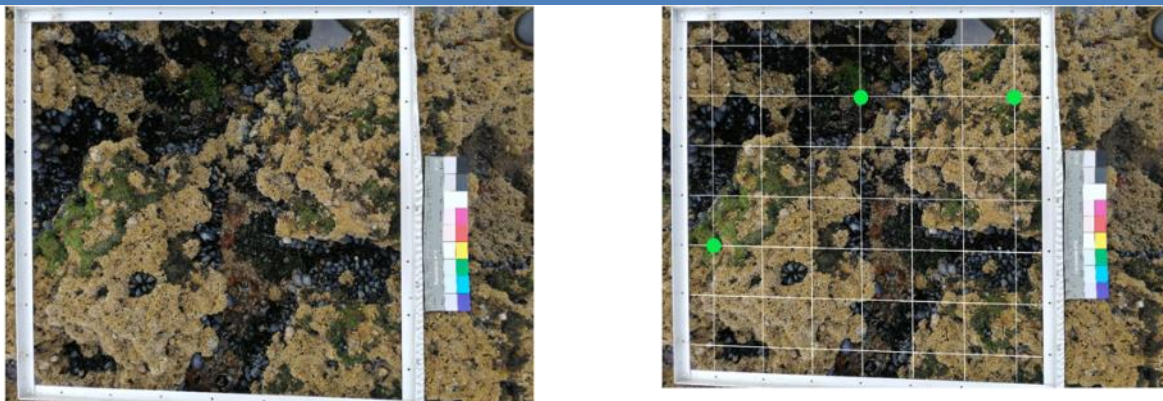


Figura 12 – Quadrado de amostragem de 0,50 x 0,50 m usado na realização de fotografias digitais para determinação da cobertura de macroalgas oportunistas.

3) Registo da descrição do local de amostragem. Para cada praia deve ainda ser preenchida, à semelhança do que foi descrito para o protocolo A, a Tabela III com a descrição visual do local de amostragem.

Processamento das amostras no campo

As amostras recolhidas através de raspagem devem ser acondicionadas em arca térmica com placas de gelo e transportadas para o laboratório em sacos plásticos devidamente identificados.

Procedimento laboratorial

Os organismos recolhidos e transportados para o laboratório devem ser identificados e assinalados na Lista Reduzida de Taxa (Tabela III) de macroalgas identificadas na costa portuguesa, incluindo classificação em grupos de estado ecológico (ESG) e de estratégia oportunista.

Normas de segurança

O ambiente rochoso entre-marés pode ser perigoso, quer no sentido de se trabalhar junto ao mar, quer no sentido do tipo de substrato em si. O substrato rochoso é normalmente escorregadio devido à presença das macroalgas e cortante devido à presença de outros organismos (por exemplo mexilhões, ouriços, etc.), pelo que o caminhar devagar durante os trabalhos é essencial para evitar quedas e/ou cortes. Assim, os trabalhos de campo nunca devem ser realizados por uma só pessoa isoladamente, isto é, o trabalho deve ser feito em conjunto (por um mínimo de duas pessoas) no caso de haver necessidade de prestar auxílio imediato.

Cada pessoa deve usar roupas adequadas e calçado que permita simultaneamente proteção, impermeabilidade e uma boa aderência ao piso (recomendam-se galochas ou botins de borracha).

Recomenda-se o uso de chapéu e de protetor solar (rosto e braços).

Sendo este ambiente marinho muito dinâmico, com a subida e a descida das marés e com ondulação sempre variável, deverá ter-se uma atenção contínua ao estado do mar, devendo evitar-se ao máximo a execução dos trabalhos de costas voltadas para o mar.

Controlo de qualidade

A DQA exige que os métodos propostos para a avaliação do estado ecológico estejam de acordo com as normas e procedimentos internacionais de amostragem do elemento e que a recolha e o tratamento dos dados sejam feitos em concordância com os processos submetidos a avaliação durante os exercícios de intercalibração realizados entre os Estados Membros da UE. Assim, os métodos de recolha e tratamento dos dados deverão ser realizados por pessoal especializado, familiarizado com este tipo de organismos e que participe regularmente em exercícios de atualização de conhecimentos.

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

Todos os processos implementados durante o projeto foram alvo de discussão e harmonização, de forma a atenuar possíveis divergências regionais ou de interpretação existentes na aplicação das metodologias necessárias.

Garantia de qualidade durante a amostragem

As campanhas de amostragem devem ser programadas em função das marés de maior amplitude, para que os três horizontes do patamar médio litoral fiquem a descoberto, e durante o verão (entre junho e setembro), para que se registem uma maior diversidade de espécies. A equipa de amostragem deve incluir elementos com formação e experiência na identificação da diversidade de espécies de macroalgas e experiência de trabalhar no espaço rochoso entre marés. Os técnicos de amostragem devem frequentar, regularmente, cursos de formação e atualização 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, comparável e reproduzível, devem ter-se em conta as seguintes recomendações:

- Seguir rigorosamente os procedimentos de amostragem definidos;
- Preencher os campos das informações relativas às campanhas de amostragem de acordo com os protocolos acima definidos, nomeadamente através do preenchimento das Tabelas I e III;
- Documentar fotograficamente os aspetos relevantes encontrados;
- Documentar fotograficamente as réplicas necessárias e devidamente identificadas para a avaliação da cobertura das macroalgas oportunistas, de acordo com os protocolos acima definidos;
- Assegurar uma correta identificação dos sacos de armazenamento das amostras recolhidas;
- Garantir que os organismos são colocados imediatamente após colheita em arcas térmicas refrigeradas com placas de gelo, de forma a evitar a sua degradação.

Garantia de qualidade em laboratório

Durante o trabalho de laboratório, de forma a garantir a qualidade dos dados, a sua integridade e a obtenção de informação pertinente, comparável e reproduzível, devem ter-se em conta as seguintes recomendações:

- Garantir que os técnicos têm formação e conhecimento das espécies de macroalgas que vão encontrar;
- Utilizar guias de identificação adequados a par com a designação atualizada dos *taxa*, consultando o website <https://www.algaebase.org/>.

Garantia de qualidade dos resultados

Os dados obtidos a partir de uma amostra e ao longo das diferentes fases dos protocolos acima definidos, devem ser manuseados cuidadosamente, compilados num único ficheiro e integrados numa base de dados. Este procedimento evita a perda de informação relevante e permite comparar a informação de campo (fichas de campo) com os resultados obtidos no laboratório (fichas de laboratório).

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

- As designações utilizadas nas fichas de campo e nas fichas de laboratório devem ser coincidentes para que, em caso de dúvida, possam vir a ser confrontadas;
- 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 eletrónico, numa base de dados que integre a informação de campo e laboratório. Os inventários (espécies e cálculos) devem ser introduzidos e posteriormente validados, de modo a eliminar erros na introdução ou manipulação dos dados.

Bibliografia

Abaye A.O., Allen V.G., Fontenot, J.P. (1997). The double DAFOR scale: A visual technique to describe botanical composition of pastures. In: Proc. American Forage and Grassland Council, Georgetown, TX. 6:96-100.

Gaspar R., Pereira L., Silva J., Melo R., Mendes R.N., Tavares A.M., Neto J.M. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. V – Macroalgas Marinhas Substrato Rochoso. APA/MONIPOR, 56p.

Neto J.M., Gaspar R., Pereira L., Marques J.C. (2012). Marine Macroalgae Assessment Tool (MarMAT) for intertidal rocky shores. Quality assessment under the scope of the European Water Framework Directive. Ecological Indicators 19: 39-47.

Pereira A. R., Trindade J., Neves M. (2005). Portugal: coastal dynamics. In: Sixth international conference on geomorphology, Zaragoza.

Wells E., Wilkinson M., Wood P., Scanlan C. (2007). The use of macroalgal species richness and composition on intertidal rocky seashores in the assessment of ecological quality under the European Water Framework Directive. Marine Pollution Bulletin 55(1-6): 151-161.

Anexos

Ficha de campo e laboratório

Todas as informações relativas às campanhas de amostragem devem ser registadas no campo de acordo com os protocolos definidos acima, nomeadamente através do preenchimento das Tabelas I e III.

Os dados laboratoriais deverão ser registados em fichas de registo próprias que se deverão arquivar, independentemente de serem processados em folha de cálculo e alvo de arquivo informático.

Tabela I – Lista Reduzida de Taxa (RTL; Reduced Taxa List) para as tipologias nacionais de massas de águas costeiras (A5, A6 e A7). Classificação dos taxa quanto a Grupo de Estado Ecológico (ESG; Ecological Status Groups), Oportunista, Espécie Exótica (EE), Potencialmente Invasora (Pot. Invasora). Presença () – observada no SE (Substrato Emergente) e/ou PM (Poça de Maré). Cobertura observada no intermareal segundo a escala DAFOR (**) (Dominante, Abundante, Freqüente, Ocasional ou Rara).*

	RTL A5	RTL A6	RTL A7	ESG	Oportunista	EE	Pot. Invasora	Presença*	DAFOR**
CHLOROPHYTA									
Bryopsidales	sim	sim	sim	II					
<i>Codium</i> eretos	sim	sim	sim	II					
<i>Codium</i> prostrados		sim	sim	I					
Verdes filamentosas	sim	sim	sim	II	sim				
Ulvaes	sim	sim	sim	II	sim				
<i>Valonia</i> spp.		sim	sim	II					
	RTL A5	RTL A6	RTL A7	ESG	Oportunista	EE	Pot. Invasora	Presença*	DAFOR**
OCHROPHYTA									
<i>Ascophyllum nodosum</i>	sim			I					
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	sim	sim	sim	I					
Castanhas filamentosas, Ectocarpales	sim	sim	sim	II	sim				
Castanhas prostradas	sim	sim	sim	II					
Castanhas com talos tubulares	sim	sim	sim	II					
<i>Cladostephus spongiosus</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Colpomenia peregrina</i>	sim	sim	sim	II		Sim	Sim		
<i>Colpomenia sinuosa</i>		sim	Sim	II					
<i>Cystoseira/Carpodesmia /Treptacantha</i> spp.	sim	sim	sim	I					
<i>Desmarestia</i> spp.	sim	sim	sim	I					
<i>Dictyopteris polypodioides</i>	sim	sim	sim	I					
<i>Dictyota dichotoma</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Fucus</i> spp.	sim	sim	sim	I					
<i>Halopteris</i> spp.	sim	sim	sim	II					
<i>Himanthalia elongata</i>	sim			I					
<i>Laminaria</i> spp.	sim	sim		I					
<i>Padina pavonica</i>	sim	sim	sim	I					
<i>Pelvetia caniculata</i>	sim			I					
<i>Phyllariopsis</i> spp.		sim	sim	I					

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

	sim	sim	sim	I					
	sim	sim	sim	II					
	sim	sim	sim	I		Sim	Sim		
		sim	sim	I					
	sim	sim	sim	II					
	sim	sim	sim	I					
	sim	sim	sim	I		Sim	Sim		
	RTL A5	RTL A6	RTL A7	ESG	Oportunista	EE	Pot. Invasora	Presença*	DAFOR**
RHODOPHYTA									
<i>Ahnfeltia plicata</i>	sim	sim		I					
<i>Anhfeltiopsis devoniensis</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Asparagopsis armata</i> (incluindo fase <i>Falkenbergia rufolanosa</i>)	sim	sim	sim	II	sim	sim	sim		
<i>Calcarias eretas</i>	sim	sim	sim	I					
<i>Calcarias crostosas</i>	sim	sim	sim	I					
<i>Calliblepharis</i> spp.	sim	sim	sim	I					
<i>Callophyllis laciniata</i>	sim	sim	sim	I					
<i>Catenella caespitosa</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Caulacanth usustulatus</i>	sim	sim	sim	II					
Ceramiales	sim	sim	sim	II					
Champiaceae	sim	sim	sim	II					
<i>Chondracanthus</i> spp.	sim	sim	sim	II					
<i>Chondrus crispus</i>	sim			I					
<i>Cordylecladia erecta</i>	sim			II					
<i>Cryptonemia</i> spp.		sim	sim	II					
<i>Cryptonemia palmetta</i>	sim			II					
Dasyaceae	sim	sim	sim	II					
Delesseriaceae	sim	sim	sim	II					
<i>Dilsea carnosa</i>	sim			I					
<i>Dumontia contorta</i>	sim			II					
Gelidiales	sim	sim	sim	I					
<i>Gigartina pistillata</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Gracilaria</i> spp.	sim	sim	sim	I					
<i>Grateloupia</i> spp.	sim	sim	sim	II		sim	Sim		
<i>Grateloupia turuturu</i>	sim	sim		II		sim	Sim		
<i>Gymnogongrus</i> spp.	sim	sim	sim	II					
<i>Halophythes incurva</i>		sim	sim	II					
<i>Heterosiphonia plumosa</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Hildenbrandia</i> spp.	sim	sim	sim	II					
<i>Hypnea musciformis</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Laurencia</i> spp., <i>Osmundea</i> spp., <i>Chondria</i> spp.	sim	sim	sim	II					
<i>Liagora</i> spp.		sim	sim	I					
<i>Lomentaria articulata</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Mastocarpus stellatus</i> (Incluindo fase <i>Petrocelis</i> <i>cruenta</i>)	sim	sim	sim	I					
Nemaliales	sim	sim	sim	II					
Outras Rhodomelaceae	sim	sim	sim	II					
<i>Palmaria palmata</i>	sim	sim		I					
<i>Peyssonelia</i> spp.	sim	sim	sim	I					
<i>Phyllophora</i> spp.	sim	sim	sim	I					
<i>Plocamium cartilagineum</i>	sim	sim	sim	I					
<i>Porphyra</i> spp.	sim	sim	sim	II	sim				
<i>Pyropia leucosticta</i>	sim	sim	sim	II		sim	Sim		
<i>Rhodophyllis divaricata</i>	sim	sim	sim	II					
<i>Rhodymenia</i> spp.	sim	sim	sim	II					
<i>Rytiphlaea tinctoria</i>			sim	II					
<i>Schizymenia dubyi</i>	sim	sim		I					
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	sim	sim	sim	I					

Elemento Biológico – Macroalgas (substrato rochoso)

Águas Costeiras

<i>Stenogramma interruptum</i>	sim	sim		II				
<i>Symphyclocladia marchantioides</i>		sim	sim	II		sim	Sim	

Tabela III – Descrição do local de amostragem

INFORMAÇÃO GERAL				
Local		Data		
Altura da baixa-mar (m)		Latitude/Longitude do ponto de acesso ao local		
Hora da baixa-mar (hh:mm)		Latitude/Longitude do local de amostragem (início do horizonte superior do patamar mediolitoral)		
DESCRIÇÕES DA COSTA				
1) Presença de Turbidez (conhecida como sendo não antropogénica)	Sim = 0 Não = 2	pontuação:	2) Abrasão por areia	
			Sim = 0 Não = 2	
			3) Costa de cré	
			Sim = 0 Não = 2	
4) Tipo de Costa Dominante (seleccionar só uma opção)			5) Sub-habitats (Seleccionar uma ou mais opções e marcar cada opção com [1]; Seleccionar a pontuação mais alta das opções marcadas)	
Cumes rochosos/ afloramentos/plataformas	Sim = 4	pontuação:	Bacias rochosas largas e pouco profundas (>3 m de largura e <50 cm de profundidade)	Sim = 4
Rocha Irregular	Sim = 3		Bacias rochosas grandes (>6 m de comprimento)	Sim = 4
Pedregulhos grandes, médios e pequenos	Sim = 3		Bacias rochosas profundas (50% >100 cm de profundidade)	Sim = 4
Rocha íngreme/vertical	Sim = 2		Bacias rochosas comuns	Sim = 3
Substrato duro não específico	Sim = 2		Fendas grandes	Sim = 3
Seixos/pedras/rochas pequenas	Sim = 1		Grandes saliências e rocha vertical	Sim = 2
Cascalho	Sim = 0		Outros habitats (especificar)	Sim = 2
			Cavernas	Sim = 1
Biota Dominante			Nenhum	Sim = 0
Ascophyllum				
Fucoides				
Rhodophyta				
Chlorophyta				
Mexilhões				
Cracas				
Lapas				
Gastropodes				
			6) Número total de sub-habitats (Contar o número de opções seleccionadas anteriormente)	
			0	Sim = 0
			1	Sim = 1
			2	Sim = 2
			3	Sim = 3
			4	Sim = 4
			>4	Sim = 4
COMENTÁRIOS		RESUMO		Pontuação:
		1) Presença de Turbidez		
		2) Abrasão por areia		
		3) Costa de cré		
		4) Tipo de Costa Dominante		
		5) Sub-habitats		
		6) Número total de sub-habitats		
		Somatório de pontuações =		
		Valor final da métrica Descrição da costa		

ERVAS MARINHAS



Elemento Biológico – Ervas Marinhas Águas de Transição e Costeiras

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

O presente protocolo tem como objetivo sistematizar e uniformizar a metodologia de amostragem e processamento laboratorial desenvolvida no âmbito da DQA para o elemento de qualidade biológica ervas marinhas (ou prados marinhos).

A monitorização e classificação da massa de água, nos termos da DQA, pressupõe o correto planeamento e cumprimento rigoroso do protocolo de amostragem e processamento laboratorial estabelecido.

Aplicabilidade

Este protocolo aplica-se a todas as tipologias de massas de água de transição e lagoas costeiras, suscetíveis ao desenvolvimento de áreas propícias ao estabelecimento de prados marinhos que, potenciados pelo reduzido hidrodinamismo ou pela disponibilidade de substrato arenoso, com níveis adequados de nutrientes, aí apresentam uma ocorrência natural.

Os procedimentos de avaliação pelos índices que fazem parte da ferramenta desenvolvida deverão ser capazes de detetar desvios nas condições ecológicas do elemento biológico, nomeadamente dos parâmetros relativos à composição taxonómica e à abundância das ervas marinhas. Este processo tem como base os dados recolhidos no campo que, através dos desvios apresentados relativamente às condições de referência definidas para o elemento, resultará na classificação da qualidade ecológica apresentada pelas pradarias de ervas marinhas em estudo.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

A DQA determina que a monitorização das ervas marinhas seja efetuada de três em três anos. No entanto, por forma de conseguir um seguimento mais próximo e eficaz, o trabalho de campo deve ser efetuado anualmente, em maré baixa, durante o verão (entre junho e setembro) (Neto *et al.*, 2013). Este corresponde ao período de consolidação destas comunidades de produtores primários nos sistemas de transição e lagunares costeiros, após a sua fase de maior crescimento.

Material e equipamento

O material necessário à operação de recolha de dados no campo deverá ser organizado antes da deslocação, atendendo à seguinte lista:

- Fichas de campo e prancheta de plástico ou madeira;
- Lápis e marcador;
- GPS;
- Máquina fotográfica;
- Botas de borracha;
- Sacos de plástico etiquetados para recolha de amostras biológicas;
- Tubo de amostragem para recolha de amostras biológicas;
- Contentor de plástico para transporte de material e de amostras;
- Arcas térmicas para transporte de amostras para o laboratório;
- Roupas adequadas ao trabalho de campo;
- Luvas descartáveis;
- Chapéu e protetor solar.

Elemento Biológico – Ervas Marinhas

Águas de Transição e Costeiras

Seleção dos locais de amostragem

Os locais de amostragem devem ser definidos antes da ida para o campo, dentro da área arenoso-vasosa intermareal dos sistemas de transição e costeiros, onde existam cobertos significativos de prados marinhos. Devem ser acessíveis de forma segura, por terra ou de barco.

Procedimento de amostragem

De uma forma geral, as diferentes metodologias usadas na monitorização de prados marinhos, baseiam-se em três tipos essenciais de indicadores:

- Composição taxonómica
- Uma medida da abundância média por espécie - i.e., densidade, percentagem de cobertura, biomassa
- Área total das pradarias em cada massa de água/sistema. A localização das pradarias acessíveis deverá ser determinada previamente por análise de imagens aéreas e visitas aos sistemas.

Assim, a amostragem, que ocorre de uma forma tendencialmente não destrutiva, corresponde à primeira fase do processo de avaliação. O procedimento geral passa, inicialmente e em cada massa de água, pela localização das manchas de vegetação que correspondam a este elemento biológico, bem como a identificação e aferição da facilidade dos acessos a essas manchas de vegetação presente no intermareal dos sistemas de transição e lagunares costeiros. Uma vez no terreno, serão recolhidos os dados necessários à aplicação das métricas que fazem parte da ferramenta de avaliação, como em seguida se especifica:

Composição taxonómica

O observador identifica e regista as espécies de ervas marinhas presentes no local, dando cumprimento ao requisito relativo à métrica 1 através do número de espécies presentes (n.º espécies);

Área coberta

Relativamente à quantificação da área coberta pelos prados marinhos (ha), o observador deverá identificar a área total que apresenta uma densidade de manchas de vegetação acima de 5% da área superficial de sedimento. Dentro desta área, deverão ser registadas as áreas parciais que apresentem diferentes densidades de manchas de vegetação (e.g., 5-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100% coberta por manchas de vegetação; Figura 1).



Figura 1 – Registo das subáreas de *Zostera noltei* com diferentes valores de cobertura.

De uma forma prática, são identificadas as áreas que apresentam uma densidade de manchas de vegetação inferior a 5% que, tal como o restante substrato coberto por outro tipo de vegetação ou sem vegetação, não é quantificado neste processo. O objetivo desta exclusão prende-se com a tentativa de não inflacionar a área coberta por prados marinhos pela presença de pequenas manchas de vegetação dispersas na superfície do sedimento.

Elemento Biológico – Ervas Marinhas

Águas de Transição e Costeiras

Pelo seu dinamismo natural, estas pequenas manchas pouco consolidadas de prados marinhos podem desaparecer no momento de amostragem seguinte, o que provocaria uma oscilação grande na área coberta por este tipo de vegetação e, conseqüentemente, geraria situações complicadas no momento de justificar tão grandes oscilações na classificação do estado de qualidade. A área que apresenta manchas de ervas marinhas em mais do que 5% da sua superfície disponível é quantificada.

Percorre-se o perímetro de cada uma das subáreas com diferentes densidades de cobertura de manchas de prados marinhos (5-25%, 25-50%, 50-75%, 75-100%), de forma que no final a soma de todas as subáreas correspondam à área total ocupada por prados marinhos (com manchas de vegetação superior a 5% da superfície). A determinação da área cobertura faz-se recorrendo a um aparelho de GPS ou a imagens de satélite validadas no terreno.

Densidade de rebentos

A terceira métrica a quantificar no campo corresponde à densidade de rebentos de plantas (ind/m^2). O avaliador percorre a pé um transeto que atravessa a área de amostragem e regista a densidade de rebentos em 3-5 pontos, que depois servirão para estimar o número médio de rebentos do coberto em estudo (densidade). Este registo pode ser feito no local, recorrendo à contagem do número de rebentos contidos numa área conhecida (e.g., tubo de amostragem de sedimentos móveis - $\varnothing 0,136\text{m}$; quadrado de amostragem – lado = $0,2\text{m}$); recolhendo amostras da vegetação (recorrendo aos amostradores indicados anteriormente) e quantificando o número de rebentos no laboratório (Figura 2); ou combinando a informação destas áreas de amostragem com o registo fotográfico da amostra no campo, sendo a densidade de rebentos contada no campo ou no laboratório comparada com a quantificação digital do número de rebentos.

Devem ser recolhidas amostras em número representativo da extensão e heterogeneidade da área coberta (mínimo três amostras), normalmente sobre um transeto que atravessa a área coberta, com o auxílio de um amostrador de área conhecida (e.g., tubo de amostragem de sedimentos móveis - $\varnothing 0,136\text{m}$; quadrado de amostragem – lado = $0,2\text{m}$), até uma profundidade que permita a recolha da parte radicular das plantas. Para o registo fotográfico, a vegetação contida no interior do amostrador deverá ser fotografada na vertical (marcar a área e retirar o amostrador para fazer a fotografia) e depois recolhida na totalidade, acondicionando individualmente cada réplica num recipiente identificado, e transportadas para o laboratório protegidas das condições ambientais mais agressivas. O registo da área e da densidade de rebentos poderá, também, ser efetuada com recurso a drone (UAV - Unmanned Aerial Vehicle), o que requer a validação prévia do processo de aquisição e tratamento das imagens. Por norma, terá de haver um processo simultâneo de aquisição e validação de dados no terreno, para que os resultados sejam seguros e reconhecidos como válidos.



Figura 2 – Amostra de *Zostera noltei* a recolher para quantificação do número de rebentos, marcada com um tubo de amostragem com $0,136\text{m}$ de diâmetro.

Elemento Biológico – Ervas Marinhas

Águas de Transição e Costeiras

Processamento das amostras no campo

As amostras recolhidas (tubadas) devem ser colocadas em baldes ou sacos de rede de malha calibrada 1mm, cuidadosamente lavadas no local para remoção do excesso de finos, acondicionadas individualmente em sacos de plástico identificados e transportados para o laboratório em arcas térmicas refrigeradas com placas de gelo para evitar a sua degradação. Para as amostras que não são fisicamente recolhidas (contagens), será apenas contabilizado e registado o número de rebentos apresentado na área de amostragem usada para o efeito.

Procedimento laboratorial

As amostras (3 a 5 por mancha de prados marinhos) transportadas para o laboratório devem ser individualmente manipuladas, procedendo-se à contagem do número de rebentos para a determinação de sua densidade. Contam-se todos os meristemas foliares de cada amostra e calcula-se a densidade para uma área padronizada (ind./m²), através da fórmula seguinte:

$$D \text{ (ind./m}^2\text{)} = R / A$$

Onde, D é a densidade de rebentos (ind./m²); R é o número de rebentos presentes em cada amostra; A é a área usada para amostrar, em m².

O valor de densidade de rebentos a usar no processo de classificação corresponde à média aritmética dos valores estimados para as réplicas recolhidas em cada local.

Normas de segurança

O ambiente intermareal estuarino pode ser perigoso, nomeadamente pelo tipo de substrato pouco consolidado e escorregadio que apresenta e pela constante subida e descida das marés. O substrato vasoso, ao contrário do sedimento mais arenoso, é o que normalmente apresenta maiores dificuldades à deslocação das pessoas, principalmente às que têm pouco contacto com este tipo de ambientes. Por esta razão, é aconselhável que as tarefas a realizar neste tipo de locais sejam realizadas pelo menos por duas pessoas, sendo que uma delas deva apresentar alguma experiência neste tipo de ambientes.

O caminhar deve ser feito com passos curtos, a velocidade constante, tentando parar o menor tempo possível em locais que apresentem um substrato muito macio. Ao retomar a marcha, deve-se ter o cuidado de deixar os dois pés disponíveis para andar, sob risco de cair de frente no sedimento por não ter os pés livres a tempo de realizar o passo em frente. Deverá soltar um pé e o outro e só depois dar o primeiro passo. O calçado deverá corresponder a um número justo ao pé, para que a bota não tenha facilidade em sair pela ação de sucção do sedimento mais vasoso.

As roupas devem ser adequadas às condições climáticas, e permitir simultaneamente proteção, impermeabilidade e boa aderência ao piso. Recomenda-se também o uso de chapéu e de protetor solar (rosto e braços) e, sendo este ambiente marinho muito dinâmico, com a subida e a descida das marés e com ondulação sempre variável, deverá ter-se uma atenção contínua ao estado do mar, devendo evitar-se ao máximo a execução dos trabalhos de costas voltadas para o mar.

Controlo de Qualidade

A DQA exige que os métodos propostos para a avaliação do estado ecológico estejam de acordo com as normas e procedimentos internacionais de amostragem do elemento e que a recolha e o tratamento dos dados sejam feitos em concordância com os processos submetidos a avaliação durante os exercícios de intercalibração realizados entre os Estados Membros da UE. Assim, os métodos de recolha e tratamento dos dados relativos aos prados marinhos deverão ser realizados por pessoal especializado, familiarizado com o tipo de organismos em causa e que participe regularmente em exercícios de atualização de conhecimentos.

Elemento Biológico – Ervas Marinhas

Águas de Transição e Costeiras

Todos os processos implementados durante o projeto foram alvo de discussão e harmonização, de forma a atenuar possíveis divergências regionais ou de interpretação existentes na aplicação das metodologias necessárias.

Bibliografia

Neto J.M., Melo R., Mace R., Martins M., Mendes R.N., Pacheco D., Parreira F., Santos R., Silva J. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. VI – Prados Marinhos. APA/MONIPOR, 43p

Neto, J.M, Barroso, D.V., Barria P. (2013). Seagrass Quality Index (SQI), a Water Framework Directive compliant tool for the assessment of transitional and coastal intermareal areas. Ecological Indicators 30, 130-137.

Anexos

Ficha de Campo e Laboratório

A Figura 3 representa a ficha de campo a usar para registar os dados no momento da amostragem do subelemento biológico prados marinhos.

Deverá ser estabelecido previamente o número de amostras a realizar em cada mancha de vegetação para a determinação do número de rebentos. Parte da informação já poderá vir pré-preenchida do laboratório, nomeadamente o sistema, o código do local, a área de amostragem do tubo de amostragem ou do amostrador, etc., de forma a não demorar desnecessariamente o trabalho no campo.

As fichas devem ser preenchidas de forma completa, ainda no campo ou à chegada ao laboratório.

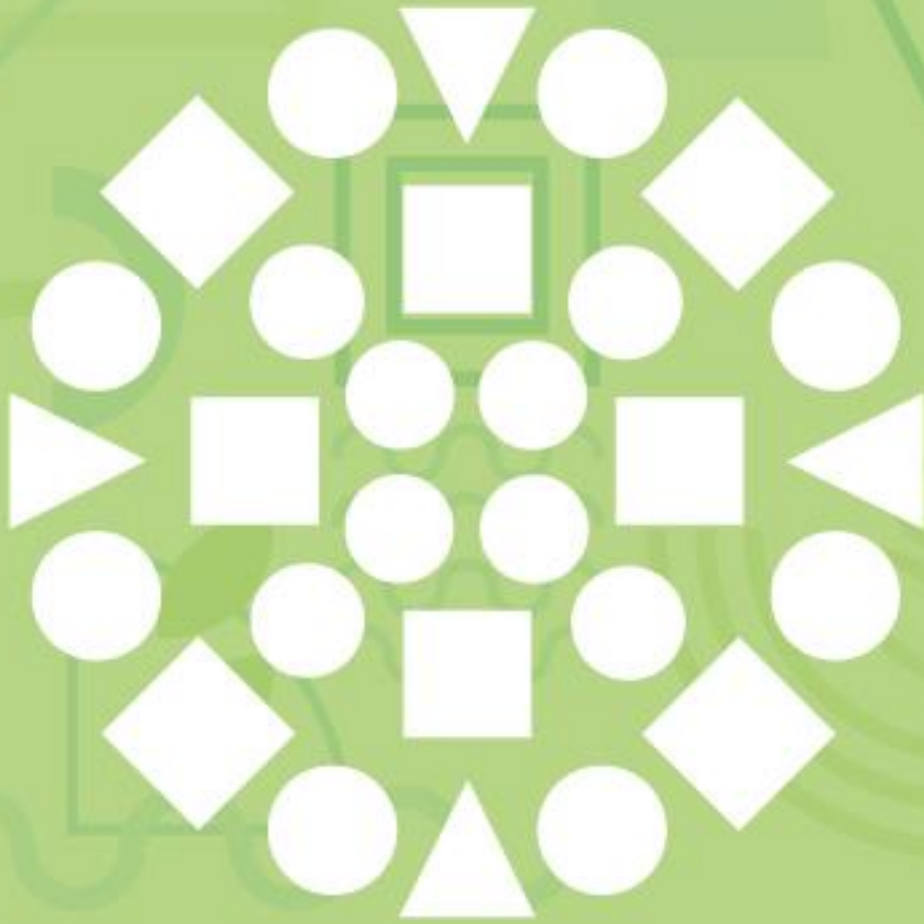
Sempre que seja possível, deverá ser feito um esquema da implantação das manchas de prados marinhos no sistema, de modo a auxiliar futuras prospeções ou a tirar dúvidas que surjam posteriormente no laboratório.

Elemento Biológico – Ervas Marinhas Águas de Transição e Costeiras

FOLHA DE CAMPO (Ervas Marinhas)											
Sistema:			Responsável:			Ponto acesso (se por terra)			OBS:		
Massa de água:			Instituição:			Lat (N):					
Local:			Equipa:			Long (W):					
Data:						Cond. climáticas:					
Hora início:			Área de amostragem:								
Hora fim:											
Core #	Coord. WGS84	<i>Zostera noltei</i>	<i>Zostera marina</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	<i>Zostera noltei</i>	<i>Zostera marina</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	<i>Zostera noltei</i>	<i>Zostera marina</i>	<i>Cymodocea nodosa</i>	
1	Lat: N: Long: W:										
2	Lat: N: Long: W:										
3	Lat: N: Long: W:										
4	Lat: N: Long: W:										
5	Lat: N: Long: W:										
Esquema das manchas de Ervas Marinhas											

Figura 3 – Exemplo de ficha de campo para o elemento biológico prados marinhos.

SAPAIS



Elemento Biológico – Sapais Águas de Transição e Costeiras

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

Este protocolo tem como objetivo sistematizar e uniformizar os procedimentos de amostragem e processamento laboratorial, desenvolvido no âmbito da DQA, para o elemento de qualidade biológica sapais.

O elemento biológico angiospérmicas – vegetação de sapais – é um dos mais importantes na preservação dos ambientes estuarinos e costeiros. Os sapais desenvolvem-se nas margens dos estuários e em zonas costeiras, em condições de baixo hidrodinamismo, onde a sedimentação permite que solos imaturos e instáveis sejam colonizados por uma sucessão de plantas tolerantes a períodos frequentes de imersão em água salgada. Distinguem-se três zonas de plantas superiores com comunidades associadas características: a zona pioneira ou baixo sapal, que se encontra na cota mais baixa e onde poucas espécies podem crescer; o sapal do meio ou mais maduro, que se encontra numa cota intermédia e mais consolidada que apresenta uma flora mais rica que a anterior; e a zona alta do sapal, mais estruturada e onde as suas espécies são parcialmente substituídas por espécies características de habitats não salgados ou por halófitas que suportam curtos e não frequentes períodos de submersão.

A monitorização e classificação das massas de água, nos termos da DQA, pressupõe o correto planeamento e cumprimento rigoroso do protocolo de amostragem e processamento laboratorial estabelecido.

Aplicabilidade

Este protocolo aplica-se a todas as tipologias de massa de água de transição e lagoas costeiras, suscetíveis ao desenvolvimento de áreas propícias à fixação de plantas de sapal que, potenciadas pelo reduzido hidrodinamismo ou pela disponibilidade de substrato vasoso rico em nutrientes, aí encontram um ambiente ideal de fixação e desenvolvimento.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

A DQA determina que a monitorização dos sapais seja efetuada de três em três anos, no final da época de crescimento, ou seja, durante o verão (em baixa-mar), por forma a incluir as espécies anuais.

Material e equipamento

O material necessário deve ser organizado antes da saída de campo, de acordo com a seguinte lista:

- Fita métrica de pelo menos 20m;
- Quadrado com 1m de lado;
- Fichas de campo;
- Placa rígida para facilitar o preenchimento da ficha de campo;
- Lápis (de preferência);
- GPS;
- Botas de borracha;
- Roupas adequadas a caminhada e chapéu;
- Luvas descartáveis;
- Repelente.

Seleção dos locais de amostragem

A seleção dos locais de amostragem está dependente da existência de manchas significativas de sapal dentro da massa de água em questão, bem como da sua acessibilidade durante a maré baixa. Assim, dentro de cada massa de água, serão identificadas as manchas de sapal que, no seu conjunto, garantam a captura de toda a diversidade de vegetação de sapal existente (zonação e espécies). Esta seleção deverá basear-se em

Elemento Biológico – Sapais Águas de Transição e Costeiras

fotografias aéreas detalhadas e no conhecimento do terreno, que permitam identificar áreas de vegetação com diferentes composições taxonómicas e definir a localização mais favorável das áreas a amostrar.

Cada local não tem, forçosamente, de apresentar todas as espécies de plantas de sapal presentes na massa de água. Cada local de amostragem tem de contribuir para que, no conjunto de todos os locais selecionados, estejam incluídas todas as espécies de plantas presentes no sapal.

Dependendo da localização geográfica e da tipologia dos sistemas a amostrar, assim se podem encontrar sapais mais extensos e de pendor menos pronunciado (com áreas de cobertura mais uniforme e amplas) ou sapais mais curtos e de inclinação mais acentuada (com uma zonação mais sinuosa e retalhada).

Para qualquer das situações, a escolha dos locais de amostragem deverá ter em conta a diversidade taxonómica e a estrutura (abundância das espécies) das diferentes manchas de vegetação, de forma que se consiga determinar com segurança para a massa de água a abundância geral de cada espécie presente no sapal.

Após a identificação através de fotografia aérea de pelo menos três locais de amostragem para cada massa de água, deverão ser estabelecidos transetos representativos das manchas de vegetação e feito o estudo da cobertura relativa das espécies presentes.

Cada local de amostragem, dependendo da sua extensão e complexidade estrutural, poderá compreender entre um e três transetos, de forma a cobrir toda a diversidade florística existente nos sapais compreendidos nessa massa de água. Em sapais mais pequenos, um transeto em cada local de amostragem, poderá ser suficiente para capturar a sua diversidade. Para sapais de maiores dimensões, cada local de amostragem poderá conter três transetos que confirmam uma representatividade clara da sua diversidade.

Procedimento de Amostragem

Nas saídas de campo deve ser feito o inventário de espécies presentes e determinada a sua cobertura relativa. Para cada massa de água deverão ser selecionados três locais de amostragem, com pelo menos um transeto em cada. Isto significa que cada massa de água terá definidos pelo menos três transetos (réplicas), representativos da sua área de sapal. O número de transetos poderá ser superior, adaptado às dimensões e complexidade da vegetação da massa de água, e deve permitir a determinação da cobertura de cada espécie, o número de manchas e correspondente área no sapal.

Se o sapal for homogéneo, cada transeto deverá ser localizado de forma aleatória, com orientação perpendicular à linha de água, e com início na margem seca e término na margem húmida (Figura 1). No entanto, para sapais mais recortados e com uma zonação menos clara, o estabelecimento dos transetos deverá obedecer a critérios diferentes, posicionando-os da forma a que melhor cubram a diversidade taxonómica e a zonação do sapal. O comprimento dos transetos é variável sendo que as amostragens, tendo o objetivo de permitir a recolha de dados de todas as zonas do sapal (alta, média, baixa e pioneira), deverão ser realizadas prioritariamente em períodos de baixa-mar. No campo, a marcação do transeto é feita com recurso a uma fita métrica que se estende de forma retilínea, desde o ponto inicial até ao final (Figura 2).

Todas as plantas que suscitem dúvidas de identificação, devem ser recolhidas e levadas para o laboratório, para posterior identificação e preservação em herbário.

Especial atenção deverá ser prestada às espécies exóticas que devem ser colhidas e transportadas para o laboratório, para identificação e preservação em herbário.

Ao longo de cada transeto, e a cada metro (Figura 3), devem ser registadas as diferentes espécies de plantas de sapal presentes num quadrado de um metro de lado ($1m^2$), e suas respetivas coberturas (Figura 4). Além das anotações, deverá ser feito o registo fotográfico dos locais amostrados e os pontos inicial e final (pelo menos) devem ser marcados com GPS. Sempre que se verifique uma transição bem marcada nas características do coberto vegetal (*e.g.*, mudança ou variação marcada na abundância das espécies presentes), por forma a ajudar ao correspondente mapeamento, à confirmação dos dados de deteção remota e ao cálculo das áreas cobertas pelos diferentes tipos de vegetação, é aconselhável a sua georreferenciação no campo através de GPS.

Elemento Biológico – Sapais Águas de Transição e Costeiras



Figura 1 - Exemplo de transetos (linhas azuis) de amostragem - Local de amostragem Sacavém/Valor Sul no estuário do Tejo.



Figura 2 - Exemplo de demarcação de um transeto para a amostragem dos parâmetros biológicos dos sapais.

Elemento Biológico – Sapais Águas de Transição e Costeiras

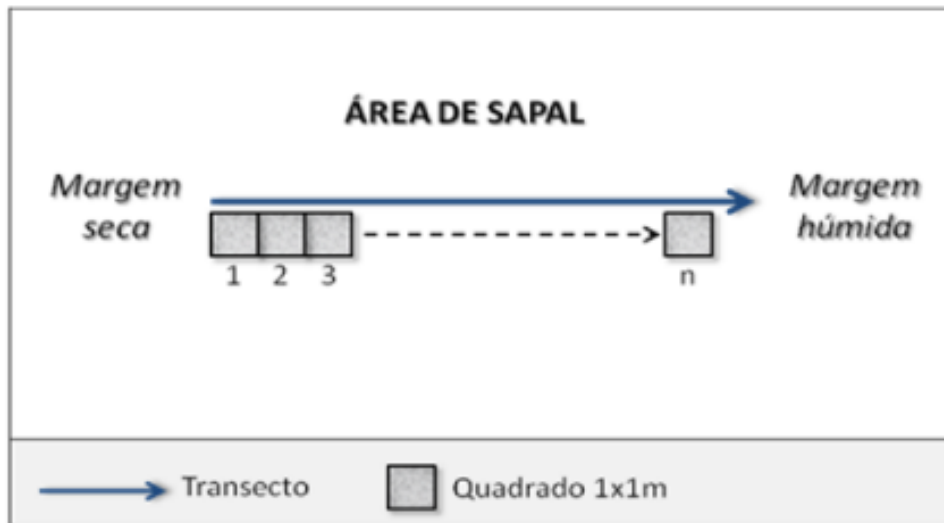


Figura 3 - Representação gráfica do delineamento experimental seguido para amostragem de vegetação de sapais.



Figura 4 - Exemplo de delimitação da área de 1x1m para a medição dos parâmetros biológicos dos sapais.

Espécies vegetais que, pela sua pequena área de ocupação (muitas vezes <1%), não estejam presentes no transecto em estudo devem ser sempre procuradas e acrescentadas à lista de espécies e contabilizadas. Exemplos dessas espécies são: *Aster tripolium*, *Cistanche phelypaea*, *Suaeda vera* e *Salsola vermiculata* (Figura 5). A sua deteção poderá ser melhorada se no regresso à margem seca, o observador realizar um percurso em ziguezague, para um lado e o outro do transecto principal, de forma a diminuir o risco da sua presença passar despercebida. Neste caso, a área ocupada por cada uma dessas espécies não deverá ser contabilizada, bastando anotar a sua presença.

Elemento Biológico – Sapais Águas de Transição e Costeiras

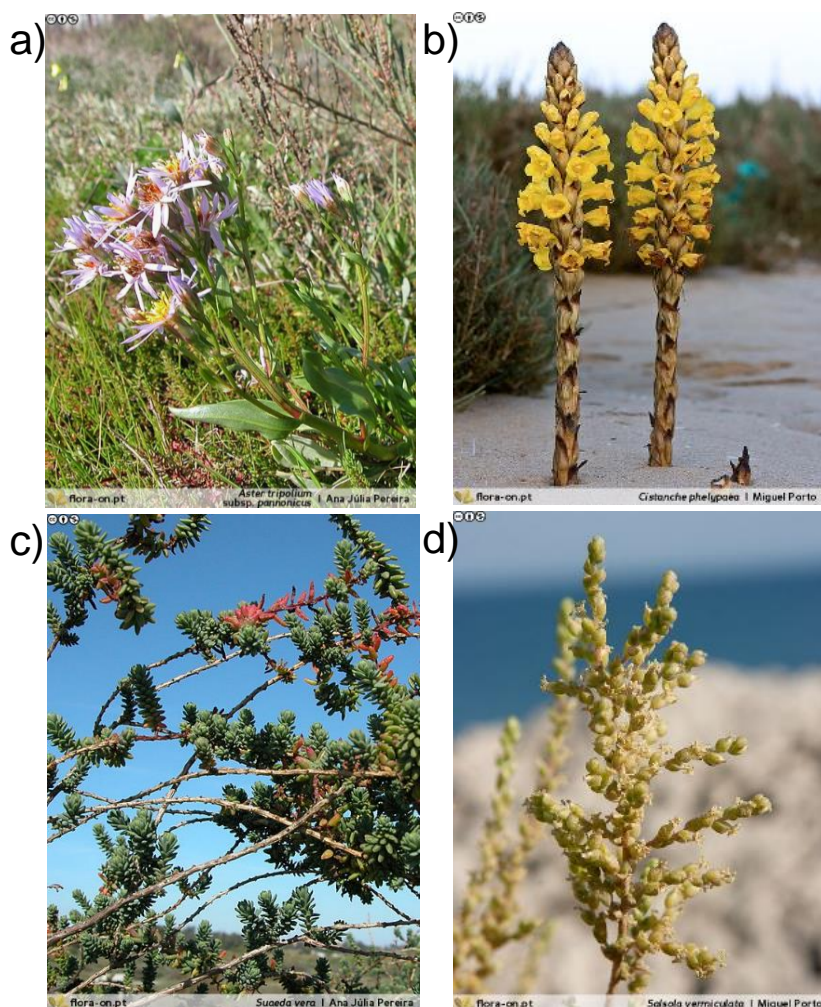


Figura 5 – Exemplos de espécies cuja ocupação pode ser inferior a 1%: a) *Aster tripolium*, b) *Cistanche phelypaea*, c) *Suaeda vera* e d) *Salsola vermiculata*. (Fonte: flora-on.pt)

Procedimento laboratorial

Através dos dados de deteção remota deverá ser calculada a área total de todos os habitats. Os transetos são georreferenciados e com auxílio de imagens de satélite e fotografias aéreas do período a avaliar, baseando-se nas informações presentes nas anotações e nos registos fotográficos, deverão ser utilizadas técnicas de deteção remota e plataformas de Sistemas de Informação Geográfica (SIG) para se extrapolar os dados dos parâmetros biológicos para toda a área de sapal presente nas massas de água monitorizadas.

Como sugestão, os passos seguintes podem ser considerados:

- Identificar nas fotos ou imagens de satélite as manchas que apresentam as mesmas características estruturais, delimitá-las no SIG e quantificar a sua área total para a massa de água;
- Através da informação proveniente dos transetos, estimar para cada uma das espécies existentes em cada tipo de coberto qual a área que ocupa (m²);
- Se houver mais do que um transeto a atravessar manchas de vegetação com as mesmas características, usar um valor médio para estimar a área ocupada por cada espécie;
- Somar todas as áreas ocupadas por uma espécie nos diferentes tipos de mancha, de modo a calcular a área total ocupada por essa mesma espécie dentro da área de sapal de cada massa de água;
- Sabendo a área total ocupada pelo sapal dentro da massa de água, calcular a abundância relativa de cada espécie, na forma de percentagem ocupada nessa massa de água;

Elemento Biológico – Sapais

Águas de Transição e Costeiras

- A informação recolhida em cada transeto deverá ser usada para identificar as manchas de vegetação de sapal com características semelhantes, de modo que se consiga quantificar a composição específica e abundância das principais espécies para cada tipo de mancha.

As plantas recolhidas no campo para confirmação taxonómica, devem ser preservadas em herbário, para possível consulta posterior. A etiqueta deverá conter todos os elementos informativos necessários, de forma a dar resposta a requisitos futuros.

Normas de segurança

A amostragem deve ser efetuada por equipas com um mínimo de duas pessoas e com formação específica. Os técnicos de amostragem devem utilizar calçado e vestuário adequado.

O conhecimento das áreas de amostragem por parte dos técnicos é fundamental para evitar situações de perigo que ponham em risco a equipa.

Sempre que a área a amostrar implique a travessia de valas e canais, esta deve ser feita dentro da máxima segurança, se possível acompanhados por quem conheça o local.

Controlo de qualidade

Garantia de qualidade durante a amostragem

As campanhas de amostragem devem ser programadas em função das características morfométricas de cada sistema, incluindo sempre a inspeção e manutenção do equipamento de campo. A equipa de amostragem deve ser constituída por operadores com formação em ecologia e com capacidade de identificação das plantas de sapal. 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, garantir que há marcação efetiva dos pontos GPS da localização dos pontos de amostragem;
- Documentar fotograficamente os aspetos relevantes encontrados;
- Seguir rigorosamente os procedimentos de amostragem definidos.

Garantia de qualidade dos resultados

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 e 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. Neste sentido, devem 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 (*e.g.*, aspetos 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 eletrónico, numa base de dados que integre a informação de campo e laboratório.

Bibliografia

Caçador I., Lopes C.L., Cardoso I., Pacheco D., Pinto M.V., Silva J., Neto J.M. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. VII – Vegetação de Sapais. APA/MONIPOR, 50p.

Elemento Biológico – Sapais Águas de Transição e Costeiras

Anexos

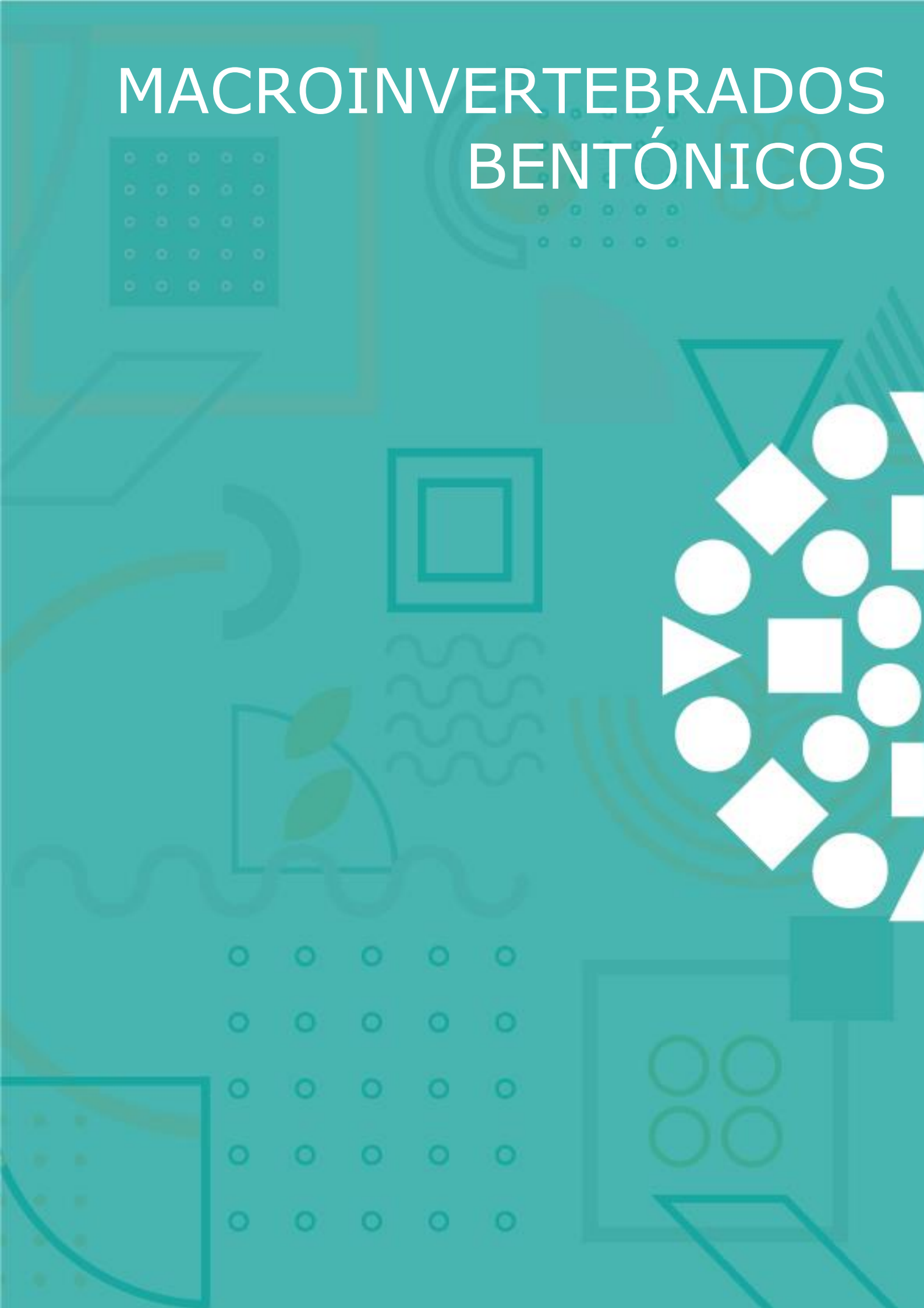
Ficha de Campo e Laboratório

A Figura 6 representa os dados a recolher no momento da amostragem para o elemento biológico vegetação de sapais. Deverá ser estabelecido previamente o número de transectos a realizar em cada massa de água, sua localização e hora a que deverá ter início, de forma a ter uma ficha de campo para cada um deles. Parte da informação já poderá vir pré-preenchida do laboratório, nomeadamente o sistema, o código do local, a designação e a hora da maré baixa, de forma a não demorar desnecessariamente o trabalho no campo. As fichas devem ser preenchidas de forma completa, ainda no campo ou à chegada ao laboratório.

FOLHA DE CAMPO				OBS:																			
Data:	Hora início:	Hora fim:	Local:		Inicial	Final	Responsável / equipa:	M	Transecto nº:														
Lattitude:								Arthrocnemum macrostachyum	Aster tripolium	Atriplex halimus	Polygonum maritimum	Halimolobos portulacaoides	Inula crithmoideles	Juncus maritimus	Limonium vulgare	Phragmites australis	Puccinellia maritima	Salsola vermiculata	Saracornia fruticosa	Saracornia perennis	Scirpus maritimus	Spartina maritima	Suaeda vera

Figura 6 – Exemplo de ficha de campo para o elemento biológico vegetação de sapais.

MACROINVERTEBRADOS BENTÓNICOS



Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentónicos

Águas de Transição e Costeiras

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

Este protocolo tem como objetivo sistematizar e uniformizar os procedimentos de amostragem e processamento laboratorial desenvolvidos no âmbito da DQA para o elemento de qualidade biológica macroinvertebrados bentónicos.

A monitorização e classificação da massa de água, nos termos da DQA, pressupõe o correto planeamento e cumprimento rigoroso do protocolo de amostragem e processamento laboratorial estabelecido.

Aplicabilidade

O elemento biológico macroinvertebrados bentónicos pode ser encontrado em todas as categorias de massa de água e diferentes tipologias de Portugal, pelo que constitui um elemento indispensável a qualquer avaliação de qualidade no âmbito da DQA. Este reconhecimento conferiu-lhe grande projeção e importância na avaliação do estado ecológico das massas de água de transição, costeiras e lagoas costeiras.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

A DQA determina que a monitorização dos macroinvertebrados bentónicos seja efetuada de três em três anos. Contudo, considera-se mais adequado que a amostragem seja efetuada com uma frequência anual, embora o resultado da avaliação seja efetuado para o período de cada três anos. O resultado do triénio, correspondente a uma determinada massa de água, será expresso através da média aritmética dos valores dos Rácios de Qualidade Ecológica (EQR, *Ecological Quality Ratios*) obtidos para essa mesma massa de água para os anos a que corresponde o triénio em causa.

As colheitas de macroinvertebrados bentónicos nas águas de transição e nas lagoas costeiras deverão ser realizadas na metade final do verão, altura em que o estado do sistema não se encontra demasiadamente influenciado pelas intempéries inverniais, e quando o risco de captar os efeitos exagerados dos recrutamentos é praticamente nulo (a atividade biológica apresenta grande expressão, mas o ruído de fundo é menor, o que facilita o tratamento e interpretação dos dados). Em termos ambientais (e.g., temperatura, pluviosidade), esta é a estação do ano que apresenta menor variabilidade interanual nestes sistemas, o que poderá contribuir para uma interpretação mais clara da resposta dos organismos aos diferentes níveis de pressão antropogénica a que possam ter estado sujeitos ao longo do tempo (e.g., eutrofização, dragagens, alterações hidromorfológicas, etc.).

As colheitas de macroinvertebrados bentónicos nas águas costeiras (costa aberta) deverão ser realizadas no final do inverno, tal como foi definido no exercício de intercalibração (Van Hoey *et al.*, 2019). Nesta altura do ano o estado do sistema aproxima-se da linha de base, correspondente a uma menor atividade biológica, menor expressão ativa da biodiversidade e, por conseguinte, menos ruído de fundo no tratamento e interpretação dos dados.

Pretende-se realizar a comparação interanual da resposta dos macroinvertebrados a diferentes pressões antrópicas ou naturais através da aplicação de métricas específicas e não a comparação ecológica entre comunidades de diferentes sistemas, como as águas de transição versus águas costeiras. Desta forma será indiferente se as águas de transição são amostradas no final do verão e as águas costeiras no final do inverno, para além de permitir uma otimização dos recursos e logística envolvidos. No entanto, as épocas estipuladas para cada sistema deverão ser sempre cumpridas.

A classificação do estado de qualidade das massas de água deverá ter especial atenção às condições de monitorização. O cumprimento dos critérios estipulados quanto à área de amostragem recomendada para cada tipologia, o número de réplicas e a malha do crivo usado são elementos da maior importância.

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentónicos

Águas de Transição e Costeiras

Material e equipamento

O material necessário à operação de recolha de dados no campo deverá ser organizado antes da deslocação, atendendo à seguinte lista:

Material para trabalho de Campo/Mar

- GPS
- Draga van Veen com cerca de 0,1 m² (0,05 m² em lagoas costeiras)
- Tina de plástico para descarga do material amostrado pela draga
- Sonda multiparamétrica
- Botas de borracha ou botas de mergulho com sola
- Fato impermeável
- Sacos de plástico grandes (plástico cristal identificados para acondicionar réplicas de cada estação)
- Elásticos para fechar os sacos
- Pá de plástico
- Balde de lavagem ou saco de lavagem com malha calibrada de 1mm
- Jarro de plástico ou outro recipiente para medição do volume das réplicas (de preferência com 1L)
- Sacos de pano numerados para acondicionamento das réplicas (aproximadamente com 40×30cm), para posterior colocação em líquido preservante/fixador
- Frascos de plástico de 60mL, para acondicionamento das amostras de sedimento para posterior análise granulométrica e de conteúdo em matéria orgânica (dois frascos por estação de amostragem)
- Bidões para transporte das amostras
- Formaldeído diluído a 4% (com água de salinidade aproximada à da amostra) e neutralizado para preservação/fixação das amostras biológicas
- Corante: rosa de Bengala ou verde metilo
- Luvas em latex ou nitrilo
- Luvas multiusos em latex ou poliuretano
- Etiquetas de papel vegetal
- Lápis
- Máquina fotográfica ou telemóvel
- Folhas de campo e prancheta de suporte

Material de Laboratório para processamento do material biológico:

- Boinhas de plástico de boca larga com tamanhos variados
- Tabuleiros de plástico
- Peneiro de 1mm
- Peneiros de malha superior a 1mm (medida da malha opcional)
- Pinças metálicas (diversas medidas)
- Colheres
- Tesoura
- Caixas de Petri
- Lupa binocular e microscópio
- Equipamento de iluminação (candeeiro ou fibra ótica)
- Equipamento fotográfico
- Jarro de plástico
- Corante: rosa de Bengala ou verde metilo
- Álcool etílico a 70°
- Lápis
- Papel vegetal
- Folha de registo da triagem e identificação
- Chaves de identificação

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentônicos

Águas de Transição e Costeiras

Material de laboratório para análise da granulometria e matéria orgânica (MO) do sedimento:

- Frasco de 60mL etiquetados (MO)
- Formas do tipo “bolo inglês” em alumínio (granulometria)
- Formas em alumínio pequenas (MO)
- Papel de alumínio
- Papel vegetal
- Papel de laboratório
- Colher
- Balança com precisão de 0.001g
- Peneiros (0,063mm; 0,250mm; 0,5mm e 2mm)
- Caixas de Petri
- Pincel duro
- Cadinhos de porcelana
- Estufa de secagem
- Mufla de incineração
- Exsiccador
- Folhas de registo

Seleção dos locais de amostragem

Para todas as categorias de massas de água, o número e a localização das estações de amostragem estão principalmente dependentes de fatores como a dimensão da massa de água, as fontes de pressão antropogénica e os tipos de substrato existentes. De modo a assegurar uma boa representatividade da massa de água, o número de estações de amostragem deverá aumentar de modo proporcional à sua dimensão e heterogeneidade. Por outro lado, a localização das estações de amostragem dependerá da existência de substrato móvel adequado – fundos móveis submareais (areia vasosa e vasa arenosa), bem como das pressões existentes em cada massa de água. Por norma, cada massa de água contém entre uma e três estações de amostragem, no caso das massas de água de transição e lagoas costeiras, e um a três transetos de amostragem, para as massas de água de costa aberta.

Dependendo da categoria ou mesmo das características específicas da massa de água a amostrar, terá de haver uma preocupação com o tipo de embarcação a usar e com o equipamento presente a bordo. O convés deverá ter espaço suficiente e adequado às necessidades da operação (e.g., descarga da draga, arrumação das amostras, colocação do material necessário à amostragem), permitindo a movimentação segura dos operadores, da draga e das amostras. A presença de um alador ou guincho (manual ou mecânico), embora não sendo obrigatório, é de extrema utilidade nos sistemas de maior profundidade.

Transição e Lagoas Costeiras

Em águas de transição e lagoas costeiras, as estações de amostragem deverão posicionar-se em áreas submareais que apresentem substrato móvel adequado (areia vasosa ou vasa arenosa) e condições batimétricas, de corrente ou ondulação que permitam a realização da operação de recolha em segurança. Se necessário, poderão ser posicionadas em áreas específicas de influência de pressões antropogénicas identificadas para a massa de água. As amostras são compostas por três ou quatro réplicas, respetivamente para águas de transição e lagoas costeiras, que não se dispersam mais do que algumas centenas de metros entre si.

Costa aberta

Em águas costeiras (costa aberta), as estações de amostragem estão agrupadas em transetos que se dispõem de forma perpendicular à linha de costa. A amostragem decorrerá sobre este transeto, às profundidades de 10, 20 e 30m (ou até ao limite da massa de água, caso não se atinja a profundidade máxima), com a recolha de três réplicas por cada um destes patamares de amostragem. Assim, se o transeto alcançar a profundidade máxima dos 30m, terá associadas três estações de amostragem, cada uma com três replicados. Se a massa de água o justificar, de modo a assegurar a representatividade, poderão ser definidos mais dois ou três transetos de amostragem, à semelhança do que se preconizou antes para estações de amostragem nas massas de água de transição e lagoas costeiras.

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentónicos

Águas de Transição e Costeiras

Procedimento de amostragem

O processo de amostragem segue o atualmente utilizado por grande parte dos países europeus e acordado no âmbito do Exercício de Intercalibração da estratégia comum de implementação da DQA (Muxika *et al.*, 2019). A aplicação da norma ISO 16665 de 2005 (para comparabilidade dos resultados) requer que a amostragem das comunidades submareais seja realizada com recurso a dragas van Veen (ou tipo semelhante), com cerca de 0,1m² de área de amostragem. Para as lagoas costeiras, devido às características próprias destes sistemas, optou-se por usar uma draga de menores dimensões, com 0,05m² de área de amostragem, por ser mais fácil de operar sem recurso a grandes embarcações ou a guinchos mecânicos ou manuais. Como anteriormente mencionado, o recurso a uma embarcação que possua um alador mecânico e um pau de carga não é imperativo, mas é aconselhável, de forma a reduzir o esforço necessário no manuseamento da draga. A área de ataque da draga deve ser estimada e registada. Deverá ser essa a medida utilizada no cálculo da densidade dos organismos.

Em cada estação de amostragem, localizada em estuários ou costa aberta, deverão ser recolhidas três réplicas – número considerado necessário e suficiente para a análise estatística e a aplicação das métricas, em termos de programas de monitorização europeus (Muxika *et al.*, 2019) – devendo ser rejeitadas as que apresentem um volume inferior a cinco litros, para substrato de areia, e dez litros em sedimentos lodosos ou, ainda, as que apresentem sinais de esvaziamento da amostra ocorrido durante a subida da draga (afundamento da superfície ao centro da amostra, em forma de “V”) ou de mau posicionamento (ou funcionamento) da draga durante a recolha (superfície da amostra desnivelada relativamente ao topo da draga). Para o caso das lagoas costeiras, optou-se pela recolha de quatro replicados que, consoante o tipo de substrato, deverão ter um volume que pode oscilar entre os 1,5 e os três litros de sedimento. Se, por um lado, para o caso das massas de água de transição e costa aberta, a recolha de três replicados de cerca de 0,1m², cumpre o recomendado de 0,250m² como área acumulada mínima a usar na monitorização da qualidade ecológica e que garanta a boa performance da métrica AMBI (Muxika *et al.*, 2007), o uso dos quatro replicados de 0,05m² cada, para as lagoas costeiras e como forma de aliviar o grande volume de amostras recolhidas ao mesmo tempo, considerou-se aqui suficiente pela abundância muito mais elevada de organismos que estes sistemas apresentam. No entanto, sempre que for possível deverá proceder-se à recolha de um quinto replicado para cumprir a área acumulada aconselhável de 0,250m².

Aspetos específicos de cada local, como a corrente no momento da amostragem, fundos em declive e vento forte podem prejudicar a operabilidade da draga, devendo-se, por isso, ter em atenção se o posicionamento da estação de amostragem e as condições de corrente são as indicadas para a amostragem. Não obstante o referido anteriormente, qualquer draga com um volume inferior ao referido para cada tipo de sedimento deverá ser rejeitada.

Em ocasiões especiais, em que não seja possível operar com a draga de 0,1m², quer por falta de embarcação apropriada com alador ou pau de carga, quer pelas condições de acesso, poder-se-á proceder à recolha de duas sub-réplicas com a draga de 0,05m², retiradas próximas uma da outra, recolhidas no mesmo saco e processadas em conjunto (constituem a mesma réplica). A área total amostrada de cada réplica (igual a duas vezes a área de ataque da draga de 0,05m²) deverá ser registada e tida em consideração no cálculo da densidade dos diferentes taxa.

O volume da réplica, bem como o seu aspeto geral no momento em que é inspecionada para validação deverão ser sempre registados, como cor, cheiro, aspeto da superfície e ainda tipo de sedimento (e.g. areia vasosa, vasa, areia cascalhenta). De igual modo, deve ser registada a informação relativa à profundidade e à hora de colheita, de modo a permitir o cálculo posterior da profundidade uniformizada de cada local. Estes dados devem ser registados na folha de campo que acompanha a operação (em anexo a esta ficha).

Variáveis ambientais

Concomitantemente com a amostragem dos macroinvertebrados bentónicos deverá ser efetuada uma caracterização físico-química da coluna de água e do sedimento. Na coluna de água, deverão ser medidas, com uma sonda multiparamétrica, as variáveis ambientais temperatura da água (em graus celsius), salinidade,

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentônicos

Águas de Transição e Costeiras

oxigênio dissolvido (concentração em mg L^{-1}) e saturação (em %) e profundidade (em metros). As medições deverão ser efetuadas junto ao fundo (e à superfície, sempre que a coluna de água for superior a 2 m ou a estratificação vertical o justifique).

Para além desta breve caracterização feita em simultâneo com as colheitas de sedimento, dever-se-á fazer uma recolha sistematizada dos parâmetros físico-químicos durante a preia-mar (e, para uma caracterização mais exaustiva, também na baixa-mar), entre as 2h antes e 2h depois do pico da maré, de forma a caracterizar todas as estações de amostragem de bentos para a mesma situação de maré. Caso este registo ocorra ao longo de todo o ciclo de maré, a caracterização ambiental será enviesada pois a recolha dos parâmetros será feita em momentos diferentes do ciclo de maré, não permitindo a correta comparação de dados ambientais entre estações de amostragem devido à dinâmica da maré. Estes parâmetros são os que mais condicionam o tipo e estrutura das comunidades bentónicas (e.g., salinidade, temperatura ou profundidade), bem como a sua condição ecológica ou estado de qualidade (e.g., oxigênio), dando fortes indicações sobre as pressões que mais influência podem ter sobre elas.

No caso das lagoas costeiras, a situação da maré pode não ser importante quando estas se encontrem fechadas. No entanto, de forma a garantir a comparabilidade, a caracterização das condições físico-químicas deverá, dentro do possível, seguir critérios semelhantes aos indicados para os outros sistemas.

Relativamente ao substrato móvel, coincidindo com as amostras de macroinvertebrados bentônicos, devem ser recolhidas amostras de sedimento para análise da granulometria (60 mL) e determinação do teor em matéria orgânica (MO) (60 mL). Para o efeito, deverá ser retirada uma pequena porção de sedimento (cerca de 20+20 mL) de cada uma das dragas com amostras bentónicas, por forma a obter duas amostras compostas, representativas da estação de amostragem. De cada réplica deverão ser recolhidos 20 + 20 mL, que serão colocados em cada um dos 2 frascos de 60 mL usados para a recolha de sedimento para análise granulométrica e de MO. A operação repete-se para cada réplica, de forma que cada frasco de 60 mL contenha 20 mL de cada réplica de sedimento. No caso das lagoas costeiras, uma draga extra deverá ser efetuada para determinação da granulometria e MO e recolhida dessa draga a quantidade total necessária para as análises.

A recolha destas variáveis é fundamental para que seja possível a verificação, em cada período de amostragem, de que não houve alterações às condições definidas para cada estação de amostragem. Isto é, que as estações caracterizadas no momento da definição dos planos de amostragem mantêm a representatividade necessária das massas de água a monitorizar. Para além disso, parâmetros como MO e granulometria são determinantes para a utilização da ferramenta estabelecida para a classificação da qualidade ecológica, na medida em que permitem a definição das condições de referência a utilizar para essa classificação e a adequabilidade das condições de referência intercalibradas.

Processamento de amostras no campo

As réplicas consideradas válidas, com vista à remoção do excesso de finos, devem ser peneiradas (in vivo) usando um crivo com malha calibrada de 1 mm e sob baixa pressão hídrica. Depois de lavadas, as réplicas são acondicionadas individualmente em sacos de plástico ou de pano, ou em frascos de plástico de boca larga, e devidamente identificados no exterior e no interior (dupla etiquetagem). As etiquetas utilizadas para a identificação devem ser resistentes à água e ao fixador/conservante utilizado e conter informação base relativa à campanha de amostragem, à massa de água, ao ponto de amostragem e réplica a que correspondem, bem como à data da realização.

A malha utilizada deverá ser, obrigatoriamente, de 1mm. A utilização de malhagens diferentes inviabilizará a aplicação das métricas definidas para quantificar o estado ecológico das massas de água com base nos macroinvertebrados. Por exemplo, a utilização de uma malha de 0,5 mm em vez da malha estipulada de 1 mm, fará aumentar de tal forma o número de indivíduos (de pequenas dimensões) que os resultados das métricas calculadas para a amostra serão incomparáveis com os valores das condições de referência definidas para cada tipologia. Se tal acontecesse, seria necessária a definição de condições de referência adaptadas às respetivas situações (adaptação dos sistemas de classificação a situações diferentes daquelas para as quais estes foram desenvolvidos).

O procedimento ideal será o de conseguir a lavagem das amostras, descrita anteriormente, no campo. No entanto, porque as condições de amostragem podem variar, dependendo de diversos fatores como a hora da

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentónicos

Águas de Transição e Costeiras

maré, condições meteorológicas e características específicas de cada amostra, pode não ser possível este procedimento no campo. Nestes casos, as amostras deverão ser acondicionadas em ambiente fresco e, posteriormente, levadas para o laboratório onde se deverá proceder à sua conservação até à respetiva lavagem. A conservação das amostras poderá ser feita através da congelação ou com uma solução de formol (referida na próxima secção deste protocolo), sendo importante que, num mesmo sistema, todas as amostras sejam conservadas seguindo a mesma metodologia.

As amostras de sedimento para análise granulométrica e de matéria orgânica, recolhidas em 2 frascos de 60mL como referido anteriormente, devem ser acondicionadas em lugar fresco e protegidas da luz do sol até à chegada ao laboratório, onde devem ser congeladas até processamento.

Procedimento laboratorial

Material biológico

No laboratório, o material biológico retido no crivo de malha 1 mm será usado no processo de classificação da amostra em questões de qualidade. Após a lavagem das amostras, a sua fixação deve ser feita com formaldeído (4% de concentração) neutralizado (recomenda-se o borato de sódio como neutralizador, embora comercialmente o formaldeído seja facilmente adquirido já neutralizado com metanol). A diluição do formaldeído deve ser feita em água com salinidade idêntica à daquela em que foram recolhidos os organismos. A posterior conservação deve ser feita em álcool etílico a 70°. Se necessário, para efeitos de triagem, corar as amostras com rosa de bengala ou verde de metilo. O uso excessivo de corante não é recomendado pelos inconvenientes e atrasos que pode trazer no momento da identificação.

No caso de ser logisticamente possível proceder à triagem do material biológico nos dias imediatamente a seguir à amostragem, as amostras poderão ser conservadas no frigorífico e triadas “in vivo”. Os organismos, separados por grandes grupos taxonómicos, deverão ser conservados em álcool etílico a 70° para posterior identificação e contagem.

Caso as amostras tenham sido imediatamente conservadas em formaldeído, antecedendo a separação dos organismos, deverá proceder-se à lavagem das amostras, em água corrente, para remoção do excesso de solução de fixação. Esta operação permite, também, a eliminação de sedimentos mais finos que não foram retirados durante a lavagem efetuada no campo. A malha do crivo a usar é 1 mm, embora normalmente se utilize uma coluna de crivos com malhas mais largas (e.g., 1 mm no fundo e 2, 4 e/ou 9,5 mm no cimo), de modo a conseguir a separação da amostra em frações de diferentes tamanhos.

Para a lavagem das amostras é aconselhável o uso de vestuário adequado, luvas e máscara protetora, e que se realize em local bem arejado ou ventilado. Deverão ser tomados cuidados acrescidos no caso da lavagem de amostras conservadas com formaldeído (produto muito tóxico e cancerígeno).

A separação dos organismos deverá ser efetuada à vista desarmada, sem recurso a lupas ou outros aparelhos de ampliação. É de esperar que o uso de corante possa ser eficiente na deteção dos organismos mais pequenos, evitando a utilização de aparelhos de ampliação de imagem. A separação dos organismos deverá ser efetuada com o auxílio de pinças (adequadas à sua fragilidade) e sob boas condições de iluminação, nomeadamente com a colocação de um candeeiro de mesa junto ao tabuleiro de triagem.

Conforme referido, caso se tenha usado uma coluna de crivos para proceder à lavagem das amostras biológicas, estas frações (e.g., 1 mm, 2, 4 e/ou 9,5 mm) podem ser mantidas separadas durante a operação de separação dos organismos. Esta medida facilita a triagem, devendo, no final, juntar-se as partes para a operação seguinte de identificação. Com vista a facilitar a operação de separação dos organismos, os tabuleiros de triagem podem ter o fundo impresso (e.g., a marcador) com uma grelha regular, com quadrículas de 4-5 cm de lado. A colocação de pequenas quantidades de amostra no tabuleiro de triagem e a inspeção individual de cada uma das quadrículas impressas no fundo poderão constituir um excelente auxílio e um método de controlo no processo de separação do material biológico. Os organismos, depois de triados, devem ser guardados separados por grandes grupos, com vista a facilitar o processo de identificação.

O remanescente das amostras, depois de triadas e os organismos retirados, devem ser reinspeccionadas por outro técnico ou poderão ser novamente acondicionadas em solução de álcool etílico a 70° e armazenadas em local seguro, com temperatura estável e fora do alcance da luz solar, para futuro controlo (repetição da

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentónicos

Águas de Transição e Costeiras

triagem). Esse controlo deverá, preferencialmente, ser levado a cabo por outro laboratório, nas mesmas condições em que decorreu a triagem original, e permitirá avaliar a incerteza associada a este processo. Entre 5-10% das amostras deverão ser guardadas para posterior submissão ao processo de controlo.

Após a separação, os organismos devem ser preservados em solução de álcool etílico a 70°. Para cada amostra, os organismos devem ser acondicionados separados por grandes grupos taxonómicos, devidamente identificados e etiquetados. Esta separação por grupos taxonómicos tem a única função de facilitar a sua identificação. Quando se proceder ao fracionamento das amostras biológicas por crivos de distintas malhas, a identificação e contagem dos organismos de uma mesma réplica deverá ser feita na mesma altura. Deste modo, evitam-se as duplas contagens de indivíduos, possivelmente fragmentados durante as fases precedentes, e facilita a sua identificação.

A identificação deve ser realizada até ao nível taxonómico mais baixo possível, preferencialmente ao nível da espécie, anotados os indivíduos não adultos (e.g., juvenis, larvas, etc.), assinaladas com “?” as incertezas de classificação (e.g., ?*Capitella*, *Capitella*?*capitata*), e indicada por “sp.” ou “spp.” a presença respetiva de uma ou mais espécies não identificadas dentro do género em causa.

Nas bases de dados nacionais as amostras devem ser identificadas de forma individualizada por códigos, onde se indica a data de colheita, os técnicos que procederam à colheita e à identificação e, no caso de ter sido auditada, os resultados da auditoria. A nomenclatura dos *taxa* por vezes é complexa, originando frequentes erros ortográficos. A fim de se evitarem estes erros ortográficos de digitação sugere-se que os resultados da identificação sejam introduzidos numa base de dados que os detete (e.g., WoRMS). Toda a informação complementar das amostras, como fotografias, fichas de campo e outras informações relevantes devem ser guardados por um período nunca inferior a 6 anos.

Os organismos de cada réplica, depois de contados e identificados, deverão ser armazenados separadamente por *taxa* (devidamente etiquetados), a fim de permitir posterior confirmação taxonómica.

Deverá ser seguida a taxonomia da base de dados MarBEF (ERMS) dedicada a taxonomia de organismos presentes nos sistemas Europeus (<https://www.marbef.org/data/erms.php>). Caso algumas espécies não figurem na MarBEF, a segunda escolha deverá recair sobre a WoRMS (<http://www.marinespecies.org/>) pois algumas espécies podem não figurar na base de dados europeia e estas 2 são concordantes. Só se a espécie não constar em nenhuma destas é que deverá ser seguida a base de dados ITIS e em último caso uma qualquer outra base de dados a qual deverá ser referenciada.

Uma coleção de referência deverá ser mantida por cada laboratório, pelo que se a quantificação de biomassa for pretendida, esta deverá ser efetuada com recurso a relações previamente determinadas de peso húmido – peso seco – peso das cinzas. Na ausência de tais relações, estas devem ser calculadas, preferencialmente, com recurso a organismos provenientes de amostras extra, colhidas paralelamente às necessárias para a monitorização. Deste modo, através da utilização destas relações de peso, todos os restantes valores de biomassa podem ser estimados com base no valor obtido para o peso húmido dos organismos, sem ser necessária a sua destruição (secagem e incineração).

Determinação da granulometria

Na determinação da distribuição granulométrica das amostras de sedimentos estuarinos, devem ser seguidos os seguintes passos metodológicos:

1. As amostras, após descongelamento à temperatura ambiente laboratorial, são inicialmente sujeitas a ataque com H₂O₂ (10%) para destruição da matéria orgânica;
2. Depois as amostras são quarteadas (separadas nos seus quadrantes), secas a 40°C e pesada a respetiva subamostra a ser usada para a análise.
3. Na determinação da distribuição granulométrica usa-se o seguinte procedimento:

- Quando a amostra é só constituída por grãos com dimensões < 2 mm, toda a análise dimensional é feita por difração a laser (para o presente caso usou-se o granulómetro modelo Coulter; 2 mm - 0,04 µm; precisão 2%).

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentônicos

Águas de Transição e Costeiras

- No caso de a amostra apresentar fração com dimensão > 2 mm, a análise deverá ser feita por integração de dois métodos: (i) a fração < 63 µm será analisada por granulometria laser; (ii) a fração > 63 µm será analisada por crivagem a intervalos de ½ Phi.

4. Por integração dos dados obtidos no passo anterior, calculam-se os parâmetros estatísticos gráficos e as percentagens das frações do sedimento. Por exemplo, frações de cascalho (> 2 mm), areia (2 mm - 63 µm), silte (63 - 4 µm) e argila (< 4 µm).

Determinação da matéria orgânica (MO) nos sedimentos

A determinação da matéria orgânica dos sedimentos exige a realização sequencial de uma série de pesagens, intercaladas com secagens e ignições desses mesmos sedimentos. Assim, deverão ser considerados os seguintes passos:

1. De cada amostra trazida do campo (não seca), após descongelamento à temperatura ambiente laboratorial, espalhar uniformemente num tabuleiro de plástico (Figura 1) e retirar uma subamostra representativa de sedimento (cerca de 5 g) através do método do quarteamento, desfazendo os torrões suavemente com ajuda de uma espátula;

2. Colocar a sub-amostra num cadinho de porcelana de cerca de 30-50 mL (Figura 1);

3. Levar os cadinhos com sedimento a secar a 105 °C durante cerca de 8 horas ou mais (períodos extra de secagem de 1 hora) até não haver variações de massa entre duas pesagens consecutivas. Transferir para um exsiccador até atingirem a temperatura laboratorial e pesar com aproximação de 0,01 g;

4. Colocar na mufla. Elevar gradualmente a temperatura até aos 440 °C e manter durante 8 horas ou mais (períodos extra de ignição de 1 hora), até não haver variações de massa entre duas pesagens consecutivas. Para pesar, transferir os cadinhos para um exsiccador até atingirem a temperatura laboratorial e pesar com aproximação de 0,01 g;

5. A diferença entre o peso seco (sedimento após secagem na estufa) e o peso após ignição da amostra (sedimento após ignição na mufla) representa o carbono orgânico contido na amostra de sedimento;

6. Assumindo que a matéria orgânica contém 58% de carbono orgânico (Nelson & Sommers, 1996), a matéria orgânica numa amostra é obtida multiplicando o carbono orgânico perdido na incineração pelo fator de 1,724. O valor da MO contida no sedimento é dividido pelo peso seco da amostra e depois multiplicado por 100 para obter a percentagem de matéria orgânica na amostra (equação 1).

$$MO \% = (PS - PC) \times 1,724 / PS \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

Onde: PS é o peso seco da amostra; PC é o peso após ignição da amostra.

Retirar o peso do cadinho para a realização dos cálculos.

Este procedimento está de acordo com ASTM D 2974 (2000) e Nelson & Sommers (1996). Com a temperatura a 440 °C utilizada na Mufla, pretende-se que haja a queima da MO e que as argilas não percam a água da sua estrutura, evitando assim que haja sobrestimação de carbono e MO. Como exemplo pode dar-se o da caulinite (mineral de argila), que perde água da sua estrutura a 550 °C (Sun *et al.*, 2009).

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentônicos

Águas de Transição e Costeiras



Figura 1 – Material de laboratório usado no processamento das amostras de sedimento. Tabuleiro de plástico usado na secagem; cadinho de Teflon para incinerar o sedimento; saco com amostra depois de seca.

Normas de segurança

A amostragem de macroinvertebrados deve ser efetuada por equipas especializadas e com um mínimo de 3 pessoas. Os técnicos de amostragem devem utilizar calçado e vestuário adequado, assim como colete salva-vidas a bordo da embarcação. Ainda por motivos de segurança, a amostragem deve ser efetuada com luvas de borracha, por forma a proteger as mãos de eventuais ferimentos durante o manuseamento da draga, para além de prevenir problemas de saúde resultantes do contacto direto com sedimentos e água potencialmente contaminados. É aconselhável, no final, proceder à desinfeção das mãos. Caso seja necessário o uso de formol para a conservação das amostras, os técnicos deverão usar luvas, bata, máscara com filtros adequados e protetores para os olhos aquando do manuseio deste conservante ou das amostras conservadas.

Controlo de qualidade

Garantia de qualidade em laboratório

Para evitar, a jusante, erros de identificação resultantes da deterioração do material biológico, é necessário um cuidado acrescido no processo de lavagem, que deve ser suave e com recurso a um chuveiro ou torneira expressora de baixa pressão. O controlo de qualidade para o processo de triagem é assegurado por uma segunda inspeção ao material remanescente dessa operação, levado a cabo por um operador diferente do mesmo laboratório ou de outro laboratório, dando a possibilidade de reforçar a atenção sobre determinado grupo de organismos.

Para uma correta identificação dos organismos é necessária a existência de pessoal técnico com formação específica em identificação de macroinvertebrados. Esta formação poderá ser obtida em instituições universitárias ou de investigação, ministrada por pessoal docente, investigador ou técnico com reconhecida experiência na identificação de invertebrados. Para que a eficiência da identificação seja maior aconselha-se que cada laboratório tenha uma coleção de referência devidamente certificada por pessoal com reconhecida experiência na identificação de macroinvertebrados (normalmente pertencente a instituições Universitárias ou de Investigação Científica). Paralelamente, é obrigatória a existência em cada laboratório local de material bibliográfico atualizado para a identificação de macroinvertebrados bentônicos, sendo também aconselhável a existência do respetivo material gráfico e/ou fotográfico. O material depois de identificado deverá ser sujeito a um processo de auditoria, motivo pelo qual os organismos identificados têm de ser conservados por um período nunca inferior a 6 anos.

O controlo de qualidade da identificação é assegurado pela criação e manutenção de uma coleção de referência para cada local. Fotografias digitais, contendo os detalhes necessários à identificação dos organismos, podem ser trocadas entre laboratórios, como forma de harmonizar identificação e taxonomia. Como reforço a este processo de controlo, todos os organismos, depois de identificados e eventualmente determinado o seu peso húmido, deverão ser armazenados separadamente por espécies e por réplica, por um período que se considere necessário (e.g., durante cada ciclo de avaliação imposto pela DQA). Novamente,

Elemento Biológico – Macroinvertebrados bentónicos

Águas de Transição e Costeiras

a conservação deverá ser feita em álcool etílico a 70°, e armazenadas em local seguro, com temperatura estável e fora do alcance da luz solar.

Garantia de qualidade dos resultados

Todo o processo de amostragem, triagem, identificação e quantificação dos invertebrados bentónicos é complexo e exigente. Deverão assim ser realizados ensaios de intercalibração para aferir os procedimentos de amostragem e processamento laboratorial, quer entre diferentes técnicos do mesmo laboratório quer entre laboratórios diferentes, de modo a identificar os possíveis erros associados às contagens e identificação.

Bibliografia

ASTM D 2974 – 00 (2000). Standard Test Methods for Moisture, Ash, and Organic Matter of Peat and Other Organic Soils, ASTM International, West Conshohocken, Pensilvânia, EUA. <http://www.astm.org>.

Nelson DW, Sommers LE (1982). Total carbon, organic carbon, and organic matter. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) Methods of soil analysis, Part 2, Chemical and microbial properties. Agronomy Society of America, Agronomy Monograph 9, Madison, Wisconsin, pp 539–552.

Muxika I., Ibaibarriaga L., Sáiz J.I., Borja A. (2007). Minimal sampling requirements for a precise assessment of soft-bottom macrobenthic communities, using AMBI. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 349, 323–333.

Muxika I., Van Hoey G., Bonne W., Salas Herrero F. (2019.) Transitional waters North East Atlantic Geographic Intercalibration Group. Benthic invertebrate fauna ecological assessment methods; EUR 29644EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-79-99321-3, doi:10.2760/784291, JRC115479.

Neto J.M., Gamito S., Silva G., Afonso C., Afonso I., Cardoso I., Costa J.L., Fernandes J., Fernández L.D., Mateus M., Medeiros J.P., Ramos D., Sousa A.P., Chaínho P. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. VIII – Macroinvertebrados Bentónicos. APA/MONIPOR, 101p.

Sun, H., Nelson, M., Chen, F. & Husch, J. (2009). Soil mineral structural water loss during loss on ignition analyses. *Canadian Journal of Soil Science*, 89, 603–610.

Van Hoey, G., Bonne, W., Muxica, I., Josefson, A., Borgersen, G., Rygg, B., G., Borja, A., Philips, G., Miles, Al., Dubois, S., Desroy, N., Buchet, R., Ximenes, MC., O’Beirn, F., Witt, J., Heyer, K., van Loon, W., Ruitter, H., Neto, J., Marques, JC., Garcia, E., Puente, A., Salas Herrero., F. (2019). Coastal waters North East Atlantic Geographic Intercalibration Group. Benthic invertebrate fauna ecological assessment methods; EUR 29640 EN, Publications Office of the European Union, Luxembourg, ISBN 978-92-79-99232-2, doi:10.2760/16318, JRC115475

Anexos

Ficha de campo e laboratório

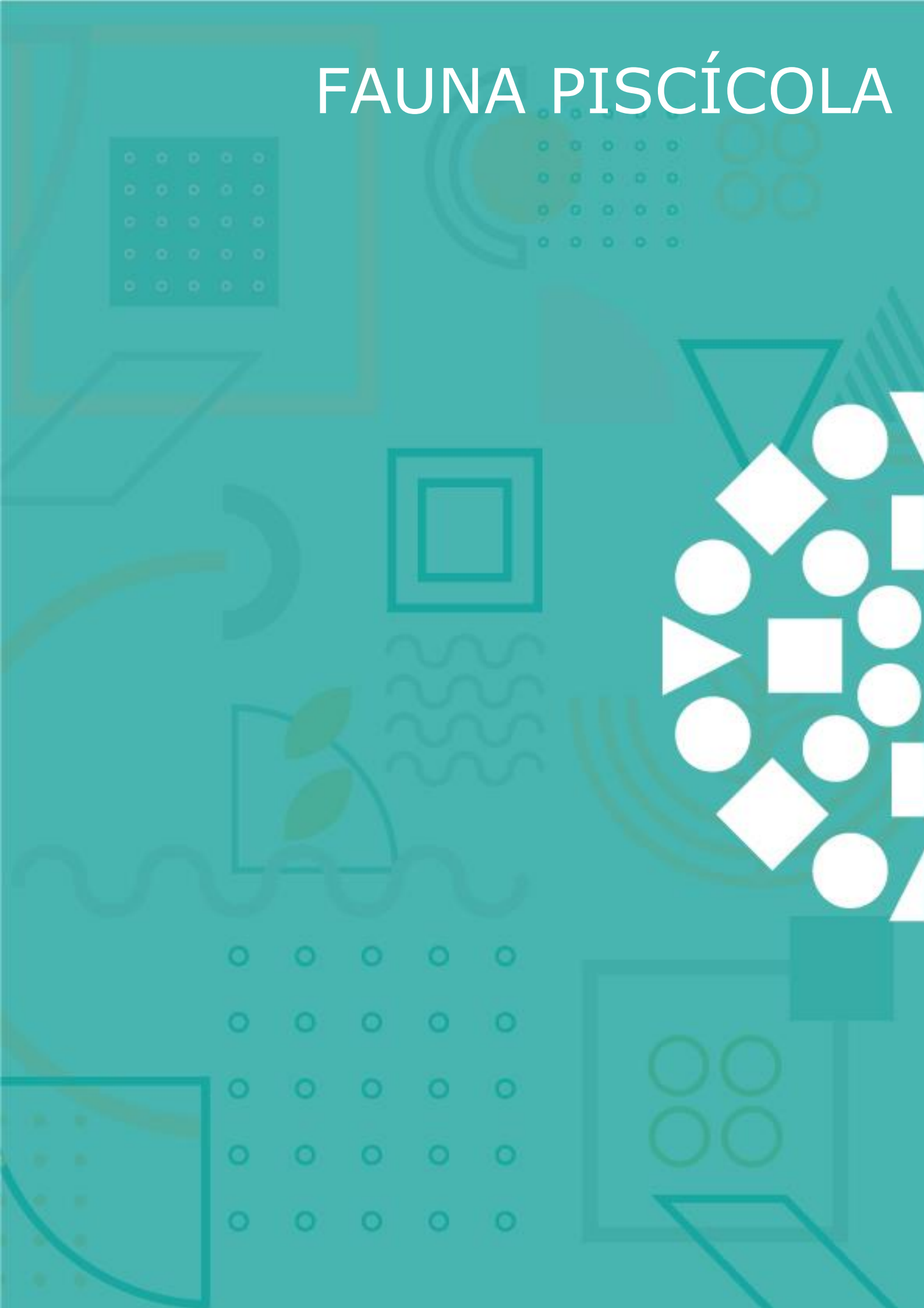
Todas as informações relativas às campanhas de amostragem devem ser registadas em formulário próprio ou ficha de campo (Figura 2).

Para cada ponto de amostragem deve ser preenchida a respetiva ficha de campo, onde consta informação relativa à campanha, localização e registo de parâmetros ambientais medidos no momento da amostragem, se possível à superfície e junto ao fundo (Figura 3). Deve ser anotado o procedimento seguido e qualquer particularidade observada.

Os dados laboratoriais deverão ser registados em fichas de registo próprias (fichas de laboratório) que se deverão arquivar, independentemente de serem processados em folha de cálculo e alvo de arquivo informático semelhante ao indicado para os parâmetros físico-químicos das amostras de água.

A informação proveniente da identificação constituirá outra ficha em que conste a taxonomia completa, registada para cada réplica, de forma a servir de base ao cálculo dos valores das diferentes métricas

FAUNA PISCÍCOLA



Elemento Biológico – Fauna piscícola Águas de Transição

Protocolo de Amostragem e Processamento Laboratorial

Enquadramento

Este protocolo aplica-se à amostragem da fauna piscícola em águas de transição (estuários). Antes do início dos trabalhos, todas as autorizações ou licenças necessárias para proceder à sua captura devem ser obtidas junto das autoridades competentes. Assim, na medida em que esta amostragem implica a operação de uma arte de pesca (arrasto de vara), é obrigatória a obtenção das licenças necessárias para o efeito junto das autoridades competentes (DGRM), bem como a comunicação à Capitania específica do sistema a amostrar e dos dias e alturas de maré em que a amostragem irá ser realizada. Em caso de amostragem em áreas protegidas, é também necessário obter a autorização do ICNF para a captura de organismos selvagens, em formulário próprio. A emissão de nova licença por esta última entidade encontra-se condicionada à apresentação de relatório onde deve constar o número de exemplares capturados por local amostrado.

Aplicabilidade

Este protocolo aplica-se às águas de transição das tipologias A1 - Estuário mesotidal estratificado e A2 - Estuário mesotidal homogéneo com descargas irregulares de rio.

A aplicação do índice EFAI (*Estuarine Fish Assessment Index* – Cabral *et al.*, 2012) para classificação pressupõe o correto planeamento e cumprimento do protocolo de amostragem e processamento laboratorial estabelecido, essencial para a sua adequada aplicação.

AMOSTRAGEM

Época e frequência de amostragem

A DQA determina que a monitorização da fauna piscícola seja efetuada de três em três anos.

As campanhas devem ser realizadas no final da Primavera, entre maio e junho (até ao final da 1ª quinzena de junho), em maré vazante e à noite. A escolha desta época tem por base a época de entrada nos estuários de espécies costeiras que utilizam as zonas de transição como viveiro (ou berçário), uma função vital destes ecossistemas e que é reconhecida no índice de qualidade ecológica dos peixes.

A metodologia de avaliação da qualidade biológica foi desenhada para amostrar a comunidade ictífica das massas de água de transição, procurando maximizar a representatividade dos diversos grupos funcionais que utilizam estes sistemas. Em Portugal Continental é entre maio e junho que a grande maioria das espécies de peixes utiliza os estuários para reprodução e/ou desenvolvimento pós-larvar e crescimento, e como tal será a época do ano que permite a captura e caracterização de maior diversidade específica e abundância de peixes.

Material e equipamento

Material para o trabalho de campo:

- Embarcação motorizada, com calado e potência de motor adequados às características das massas de água a amostrar, com capacidade para a operação de pesca de arrasto de vara e para operadores e tripulação (geralmente 3 a 4 pessoas);
- Arrasto de vara (Figura 1) com as seguintes características:
 - Comprimento da vara – 2 m;
 - Altura dos patins – 50 cm;
 - Malha da rede (5mm, no fundo do saco);
 - Arraçal com 1 corrente metálica (pode ser necessário aumentar ou diminuir o peso no arraçal tendo em conta o tipo de substrato da zona de amostragem, consoante a menor ou maior proporção de sedimento fino ou vasoso).

Elemento Biológico – Fauna piscícola

Águas de Transição

- Cabo para o arrasto (comprimento dependerá da profundidade da zona a amostrar, em geral deverá ser 3x a profundidade);
- Sonda multiparamétrica, devidamente calibrada antes de cada utilização [para medir salinidade, temperatura e oxigénio (opcional)];
- GPS;
- Arcas térmicas para transporte das amostras;
- Sacos para armazenamento das amostras, devidamente identificados e etiquetados por ponto de amostragem (incluindo identificação da massa de água) e lance. É essencial garantir um número de sacos por lance que permita acondicionar em separado espécies com relações de predação (geralmente 5 sacos por arrasto e 5 a 10 sacos extra no total);
- Ictiómetros para medição dos indivíduos libertados;
- Tabuleiros de triagem (1 a 2);
- Gelo (de preferência) ou acumuladores;
- Folhas de campo;
- Licença para a operação da arte de pesca;
- Profundímetro (opcional - se a embarcação tiver sonda de profundidade ou a sonda multiparamétrica tiver um sensor para este parâmetro);
- Máquina fotográfica com flash (opcional);
- Equipamento de segurança pessoal (colete salva-vidas, calçado apropriado e roupa impermeável, luvas, frontal ou luz de mineiro).

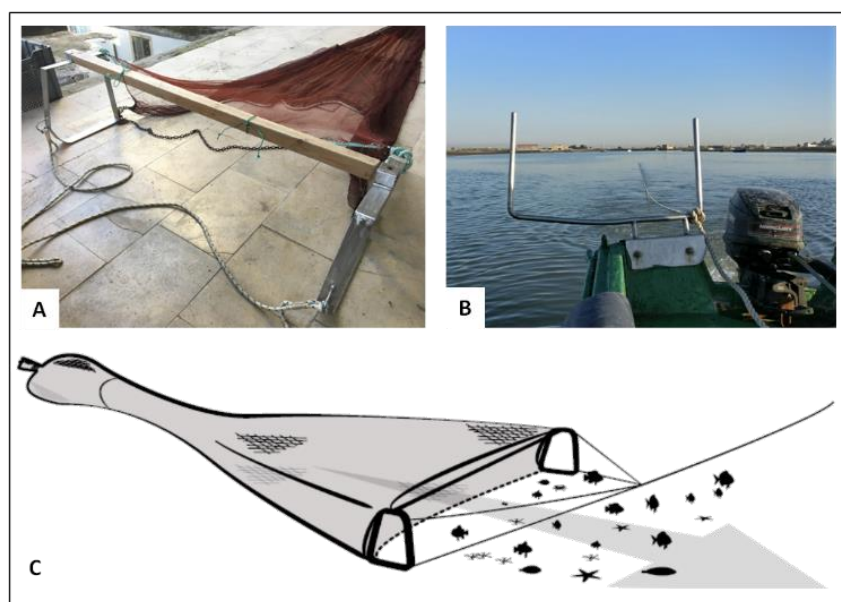


Figura 1 - Fotografia de um arrasto de vara (A), de uma operação de pesca com um arrasto de vara (B), e representação esquemática de um arrasto de vara (C).

Material para o processamento laboratorial:

- Balança com precisão adequada à gama de peso dos indivíduos amostrados;
- Réguas e craveiras com precisão adequada à gama de tamanhos dos indivíduos amostrados;
- Tabuleiros de triagem;
- Pinças;
- Guias de identificação;
- Lupa binocular.

Seleção dos locais de amostragem

Elemento Biológico – Fauna piscícola

Águas de Transição

A seleção dos locais a amostrar está dependente das condições que permitem a operação da pesca por arrasto de vara, sendo as principais condicionantes a profundidade do local, a reduzida velocidade da corrente, o tipo de fundo (arenoso ou vasoso), a ausência de peguilhos (detritos ou troncos de árvores) que possam danificar as redes, e vento e ondulação reduzidos. No entanto, a amostragem deverá ser aleatória, considerando as zonas possíveis de serem arrastadas (tendo em conta os aspetos relacionados com questões logísticas ou operacionais), devendo ser realizados entre 3 e 5 lances de arrasto de pesca viáveis por massa de água (i.e., em que a arte venha a trabalhar bem, em áreas que sejam representativas da massa de água).

Por áreas representativas de uma massa de água entende-se áreas onde seja possível amostrar de uma forma holística a comunidade de peixes característica dessa massa de água, tendo por base informação disponível em trabalhos anteriores. Como tal, é necessário efetuar um levantamento prévio da informação disponível relativo a habitats presentes, e quanto à ocorrência, abundância e distribuição por habitats das espécies de peixes anteriormente descritas para cada massa de água, por forma a planear os locais passíveis a amostrar. Esta informação permitirá também avaliar, no decorrer da amostragem, a eficiência da mesma, analisando se são capturadas as espécies de peixes mais abundantes, e se há representantes dos diferentes grupos ecológicos (e.g. juvenis de espécies migradoras marinhas) nos arrastos realizados, tendo como ponto de comparação a caracterização prévia da comunidade de peixes para a área em questão.

É também essencial um conhecimento ou reconhecimento prévio dos locais passíveis de serem amostrados em cada massa de água (e.g. locais de amostragem por arrasto de vara em estudos anteriores), sendo importante ter em consideração que podem ter ocorrido alterações das condições ambientais entre períodos de amostragem, nomeadamente quanto ao tipo de sedimento do fundo, profundidade (no período da maré vazante), presença de habitats sensíveis (e.g., ervas marinhas), e assim maximizar a eficiência da pesca com arrasto e garantir o menor impacto possível em habitats sensíveis.

Procedimento de Amostragem

Na execução da amostragem da fauna piscícola deve ser realizada a georreferenciação (GPS) dos pontos inicial e final de cada arrasto, a duração do arrasto e a profundidade do local amostrado.

Devem ser efetuados 3 a 5 replicados (lances ou arrastos viáveis) por massa de água, sendo preferível maximizar, sempre que possível, o esforço de amostragem, optando pela realização dos 5 arrastos. Massas de água de maior dimensão devem ser impreterivelmente caracterizadas com 5 arrastos. Os arrastos deverão ser efetuados em período de maré vazante e durante a noite. Em massas de água pouco profundas, dever-se-á optar por realizar a amostragem durante marés de maior amplitude, e iniciar a amostragem no pico da preia-mar. Os arrastos deverão ser realizados a favor da corrente e percorrer uma extensão de cerca de 300 metros (podendo haver exceções, em função da dimensão de área arrastável da massa de água ou de imponderáveis).

Os pontos de GPS iniciais e finais de cada lance devem ser registados na ficha de registo de campo, bem como a duração temporal de cada lance (aproximadamente 10 minutos). O ponto inicial de cada lance deve ser registado apenas quando o arrasto tenha atingido o fundo e estiver a operar (cabo esticado).

Toda a fauna acompanhante amostrada em cada arrasto deve ser separada e tratada juntamente com as respetivas amostras ictícas. A presença e abundância da fauna acompanhante servem de indicador da eficiência ou viabilidade do arrasto, mesmo que a captura de espécies ictícas tenha sido reduzida, e poderá ser utilizada para ajudar a analisar os resultados obtidos com a ictiofauna. É fundamental ter em conta a separação de espécies com relações de predação em sacos diferentes para minimizar a perda de material amostrado (e.g., caranguejos).

Sempre que forem capturados espécimes com estatuto de conservação, deve-se registar a sua ocorrência, medir o comprimento total dos indivíduos, se possível fotografá-los, e libertá-los caso estejam em condições de sobrevivência, recolhendo o mínimo necessário para confirmar em laboratório a sua correta classificação taxonómica. Esta prática deverá ser reiterada para outras espécies, sempre que tal seja possível.

Elemento Biológico – Fauna piscícola

Águas de Transição

Variáveis ambientais

Concomitantemente com as operações de pesca com arrasto de vara deverá ser efetuada uma caracterização físico-química da água. No início ou final de cada arrasto deverão ser medidas as seguintes variáveis ambientais: temperatura da água, salinidade, oxigénio dissolvido e profundidade. As medições deverão ser efetuadas à superfície e junto ao fundo, neste último caso apenas se a estratificação vertical da coluna de água o justificar (por medição no local, ou com base em informação prévia).

Processamento de amostras no campo

Após a realização de cada arrasto, todos os indivíduos capturados devem ser guardados em sacos devidamente etiquetados, com nome do local, n.º de arrasto, massa de água, data, hora de início e outra informação considerada relevante. Na distribuição dos indivíduos pelos diferentes sacos, é fundamental ter-se em conta a preservação da sua integridade e a facilitação do posterior processamento laboratorial (por exemplo, não armazenar conjuntamente caranguejos e peixes; dividir os peixes por espécies ou grupos afins).

Em caso de capturas de um grande número de indivíduos (mais de 50) da mesma espécie poderá ser feita uma subamostragem ou fracionamento, devendo registar-se sempre quais as espécies alvo de fracionamento e a magnitude do mesmo (e.g. Gobiidae fracionados a metade).

Os indivíduos capturados e a transportar para o laboratório deverão ser colocados o mais rapidamente possível em arcas térmicas com gelo e mantidos a baixa temperatura. À chegada ao laboratório as amostras deverão ser congeladas em arcas frigoríficas a -20°C.

Procedimento laboratorial

No laboratório, todos os indivíduos deverão ser identificados até à espécie, medidos (comprimento total com precisão de 1 mm) e pesados (peso total com precisão de 0,01g). O comprimento dos indivíduos é importante para determinar a estrutura etária dos espécimes capturados, o que é particularmente relevante para o cálculo da métrica relativa às espécies que utilizam os estuários como zona de viveiro.

Todos os indivíduos capturados com os peixes (fauna acompanhante) deverão ser identificados e, por espécie, contados e pesados em conjunto.

Normas de segurança

A amostragem da fauna piscícola deve ser efetuada por equipas com um mínimo de duas pessoas, em que pelo menos um dos elementos tem experiência prévia com a operação da pesca por arrasto de vara. Os técnicos de amostragem devem utilizar calçado e vestuário adequados às operações de amostragem e às condições climáticas, assim como colete salva-vidas e lanterna frontal. Ainda, por motivos de segurança, a amostragem deve ser efetuada com luvas de borracha, por forma a proteger as mãos de eventuais ferimentos aquando do manuseamento das artes de pesca ou dos organismos, para além de prevenir problemas de saúde resultantes do contacto direto com águas potencialmente contaminadas. É aconselhável, no final, proceder à desinfeção das mãos.

No manuseio do material biológico é preciso ter em conta que algumas espécies podem ser urticantes, venenosas ou dar choques elétricos, e ainda que o seu manuseamento pode causar ferimentos pelo contacto com espinhos, pinças ou outros, pelo que é fundamental todo o cuidado para prevenir ferimentos.

A agitação marítima e as condições de vento e de chuva devem ser propícias à realização da amostragem de peixes em segurança. A operação de pesca deve decorrer devidamente sinalizada, e todas as autorizações e comunicações prévias às entidades responsáveis devem ter sido realizadas com a devida antecedência.

Elemento Biológico – Fauna piscícola

Águas de Transição

Controlo de qualidade

A Diretiva 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 de controlo e garantia de qualidade (QA/QC) (NP EN ISO/IEC 17025:2017) e que participem regularmente em exercícios de intercalibração (Proficiency Testing Programmes).

Garantia de qualidade durante a amostragem

As campanhas de amostragem devem ser programadas em função das características morfológicas de cada sistema, incluindo sempre a inspeção e manutenção do equipamento de campo e a calibração das sondas. A equipa de amostragem deve incluir elementos com formação e experiência na operação da arte de pesca de arrasto de vara. 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, comparável e reproduzível, deve ter-se em conta as seguintes recomendações:

- Preencher os campos da ficha de campo, tentando, sempre que possível, completá-la na sua totalidade e garantindo que há marcação efetiva dos pontos GPS do início e final do arrasto;
- Documentar fotograficamente, sempre que existam condições de luminosidade adequadas, os trabalhos em execução, o local de arrasto e área envolvente e outros aspetos considerados relevantes;
- Seguir rigorosamente os procedimentos de amostragem definidos anteriormente;
- Assegurar uma correta identificação dos sacos de armazenamento da amostra de cada arrasto, nomeadamente com indicação da data, massa de água e sistema;
- Garantir uma correta separação das espécies de cada arrasto, de forma a evitar a predação pós captura;
- Garantir que os organismos são colocados imediatamente em gelo, de forma a minimizar o mau estar animal;
- Assegurar a eficiência do arrasto, e se necessário repetir o lance (e.g., arrasto virou, rede não estava esticada ou apresentava rasgões);
- Acondicionar cuidadosamente as amostras antes de efetuar o seu transporte.

Garantia de qualidade em laboratório

- Garantir que os técnicos têm formação e conhecimento das espécies que vão encontrar;
- Utilizar guias adequados (e.g. Whitehead *et al.*, 1986) e ter o equipamento calibrado, de modo a permitir fazer todas as medições dentro das gamas adequadas para as dimensões (comprimento e peso) da fauna capturada.

Garantia de qualidade dos resultados

Os dados obtidos a partir de uma amostra e ao longo das diferentes fases do presente protocolo, devem ser manuseados cuidadosamente, compilados num único ficheiro e 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, devem 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;
- 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 eletrónico, numa base de dados que integre a informação de campo e laboratório. Os inventários (espécies e contagens) devem ser introduzidos e posteriormente validados, de modo a eliminar erros na introdução dos dados.

Elemento Biológico – Fauna piscícola

Águas de Transição

Bibliografia

Cabral, H. N., V. F. Fonseca, R. Gamito, C. I. Gonçalves, J. L. Costa, K. Erzini, J. Gonçalves, J. Martins, L. Leite, J. P. Andrade, S. Ramos, A. Bordalo, E. Amorim, J. M. Neto, J. C. Marques, J. E. Rebelo, C. Silva, N. Castro, P. R. Almeida, I. Domingos, L. S. Gordo & M. J. Costa (2012). Ecological quality assessment of transitional waters based on fish assemblages in Portuguese estuaries: The Estuarine Fish Assessment Index (EFAI). *Ecological Indicators* 19: 144-153.

Fonseca V., Gonçalves J.M.S., Costa J.L., Cabral H., Domingos I., Escibano P., Henriques S., Monteiro P., Oliveira F., Pais M., Reis-Santos P., Neto J.M. (2020). MESCLA – “Melhorar e Complementar os Critérios de Classificação do Estado das Massas de Água de Transição e Costeiras” (Projeto POSEUR-03-2013-FC-000001). Relatório Final – Vol. IX – Ictiofauna. APA/MONIPOR, 70p.

Whitehead, P.J.P., Bauchot, M.L., Hureau, J.C., Nielsen, J., Tortonese, E. (1986). *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean (FNAM)*. Book, ISBN:92-3-002215-2 (v.1), 92-3-002308-6 (v.2).

Anexos

Ficha de Campo e Laboratório

Todas as informações relativas às campanhas de amostragem devem ser registadas em formulário próprio, ou ficha de campo (Figura 2).

Sistema _____			Data _____ / _____ / _____				
Barco _____	Rede _____		Folha _____ / _____				
MA _____							
Arrasto Nº _____							
	Ponto GPS	Hora	Latitude	Longitude	SAL	O2	Temp
Início	_____	_____	_____° _____' _____" N	_____° _____' _____" W			
Fim	_____	_____	_____° _____' _____" N	_____° _____' _____" W			
Profundidade _____							
Amostra Fraccionada? Quanto? _____							
Observações _____							

Figura 2 - Ficha de campo para preenchimento com informação sobre local de amostragem, metodologia de amostragem e variáveis físico-químicas medidas no momento da amostragem (1 ficha para cada amostra).

Os dados laboratoriais deverão ser registados em fichas de registo próprias (fichas de laboratório) que se deverão arquivar, independentemente de serem processados em folha de cálculo e alvo de arquivo informático (Figura 3).

Elemento Biológico – Fauna piscícola Águas de Transição

Sistema _____	MA _____	Data ____/____/____	
Espécie _____	Arrasto nº _____		
Individuo	Comprimento	Peso individual	Observações
1			
2			
3			
...			
n			
Nº indivíduos _____		Peso total _____	

Figura 3 - Ficha de laboratório para recolha de dados (1 ficha para cada espécie).



Rua da Murgueira, 9
Zambujal - Alfragide
2610-124 Amadora

geral@apambiente.pt
T. (+351) 21 472 82 00

apambiente.pt

