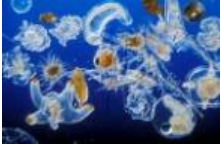


## PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO E PROCESSAMENTO LABORATORIAL

ELEMENTO	FITOPLÂNCTON	
CATEGORIA	COSTEIRAS E TRANSIÇÃO	

## PROTOCOLO DE MONITORIZAÇÃO

## AMOSTRAGEM

**Método de amostragem de água**

As recolhas para o elemento fitoplâncton executam-se nas mesmas estações e em simultâneo com os elementos físico-químicos (FQ/Q).

Em cada ponto de amostragem (#) as colheitas realizam-se em baixa-mar e preia-mar, com garrafa Niskin a 0.5 m de profundidade. Quando a estação tiver uma profundidade inferior a 2m deve usar-se uma garrafa que evite a influência de água com ressuspensão de sedimento. As fichas de campo serão as mesmas dos elementos FQ/Q (a hora de amostragem deve figurar explicitamente).

Amostras de água por ponto de colheita:

Clorofila a (propõe-se em triplicado): 3 a 6 garrafas de plástico (água comercial) de 1.5 L deverão ser cheias e guardadas em mala térmica no escuro. No mar, ou em preia-mar nas estações mais próximas do mar dos sistemas de águas de transição/lagoas costeiras abertas, deverá recolher-se pelo menos 6L (triplicados de um mínimo de 2L)

Composição fitoplanctónica: 1 frasco de 250ml de vidro escuro ou plástico castanho onde se colocou previamente 2.5 ml de Solução de Lugol neutra (concentração final da amostra → 1%). A amostra de água deve assim ser introduzida sobre o preservante e deve ser guardada no escuro.

Solução de Lugol: 20g de Iodeto de Potássio + 10 g cristais de Iodo + 200ml água destilada.

## PROCEDIMENTO LABORATORIAL

### Método de determinação de clorofila a

- Volume de água a filtrar por amostra: 0.5 a 3L (Atenção: filtrar pelo menos 2 L no mar ou em PM nas estações junto à foz dos estuários)
- Filtros de fibra de vidro equivalente a WHATMAN GF/F, 47 mm diâmetro (=0.8 µm)
- Volume de acetona: 6ml
- Centrifugação: 4000 a 5000 rpm durante 10m
- Comprimentos de onda: opta-se por 664nm (já que deve ser entre 663 e 665nm) e 750 nm (dever-se-á usar equação tricromática de Lorenzen (1967), embora também se possa optar pela de Jeffrey & Humphrey (1975)).

### Procedimento:

Agitar bem os frascos antes de realizar as sub-amostragens. Depois de filtrar a água (até que os filtros fiquem bastante coloridos), tomar nota do volume filtrado, enrolar o filtro em cilindro com ajuda de pinça e colocar em tubo de centrifuga etiquetado com indicação da estação e volume de água filtrada e guardar em congelador se possível não mais de um mês.

Para extrair os pigmentos, adicionar 4ml acetona nos tubos e macerar bem os filtros com triturador (ou em alternativa com vareta de vidro ou metal). Deixar extrair durante 24h no congelador. No dia seguinte, adicionar 2ml para completar os 6ml acima indicados. Centrifugar a 4000 a 5000 rpm durante 10m. Ler em espectrofotómetro nos vários comprimentos de onda indicados.

O método e equações a utilizar serão de acordo com Lorenzen (1967):

$$\text{clorofila } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times K [(A_{664} - A_{750}) - (A_{664a} - A_{750a})] \times v}{V \times L}$$

$$\text{feofitina } a \text{ (}\mu\text{g L}^{-1}\text{)} = \frac{A \times K [R (A_{664a} - A_{750a}) - (A_{664} - A_{750})] \times v}{V \times L}$$

em que:

$v$  = volume de acetona usado para a extração (ml)

$V$  = volume de água filtrado (L)

$L$  = passo óptico da "cuvette"

$A = 11.4$

$R$  = valor máximo da razão 664/664a, na ausência de feopigmentos, 1.8.  
(Note-se que este valor varia ligeiramente segundo os autores, devendo ser determinado experimentalmente, com clorofila a pura)

$K$  = factor destinado a restabelecer a concentração inicial em clorofila a a partir da redução da absorvância,  $= R / (R-1)$ , ou seja, 2.25.

### Identificação e quantificação da composição fitoplanctónica

Para quantificação do fitoplâncton em microscópio invertido deve utilizar-se a norma europeia nº15204 de 2006, com base na técnica de Utermöhl (Hasle, 1978a,b), de que se destacam os seguintes procedimentos:

- Homogeneização da amostra deverá ser realizada durante vários minutos com movimentos lentos de cambalhota e circulares horizontais, manualmente ou com agitadores apropriados.
- O volume de cada sub-amostra de água a sedimentar será dependente das concentrações de plâncton da amostra e da área da câmara de contagem. Poderá ser entre 50-100ml de água em amostras de mar até poucos ml em águas com grandes concentrações em fitoplâncton. Poderá também depender das quantidades de matéria em suspensão. De notar que a altura das câmaras de sedimentação não deverá exceder 5 vezes o diâmetro da câmara.

Para amostras fixadas com Lugol, o tempo de sedimentação deverá ser, em horas, cerca de 3 vezes o nº de cm de altura da câmara de sedimentação (Margalef, 1969). São aconselhados os seguintes tempos:

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

- No final da sedimentação deve deslizar-se a coluna e cobrir com vidro a câmara de forma a evitar bolhas de ar.
- 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 respectivos géneros, ou em categorias taxonómicas superiores. Como referência geral para nomenclatura das espécies pode seguir-se o trabalho de Moita e 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.
- A contagem das células fitoplanctónicas deve efetuar-se de acordo com o seguinte critério:
  - (i) as células de maior dimensão serão contadas em toda a câmara ou em metade da câmara (varrimento de toda a câmara em transectos alternados), com uma ampliação de 160x a 200x;
  - (ii) os organismos de menor dimensão deverão ser contados em 0.1-1 ml da amostra, ou seja em nº de campos de contagem equivalentes a este volume sedimentado numa ampliação de 400x
  - (iii) se ocorrer uma espécie muito abundante esta poderá ser contada com uma ampliação de 160x a 200x, ou mesmo em 400x, num ou vários diâmetros da câmara, até se obter um número igual ou superior a 200. A concentração de células na amostra será calculada em função do cálculo da área do transecto do diâmetro relativamente à área total da câmara.
  - (iv) deverão contar-se as células das colónias e não cada colónia como uma unidade.
  - (v) Não deverão ser contadas células partidas ou vazias. Poderão ser exceção a esta regra algumas células bastante compridas (e.g. *Rhizosolenia*, *Proboscia*) se tiverem cloroplastos pois podem facilmente partir-se com a homogeneização.
  - (vi) Os resultados deverão ser apresentados de acordo com a expressão

$$N_{sp1} = X_{sp1} \frac{A}{a \times v}$$

onde:

**N** é o nº de células da sp1 por unidade de volume (L)

**X** é o nº de células total contadas na câmara (ou por transecto, campo, etc) da sp1

**A** é a área total da câmara

**V** é o volume de sub-amostra sedimentado na câmara

**a** é a área do campo ou de um transecto em que se efetuaram as contagens.

### **Seleção de amostras para os estudos da abundância e composição fitoplanctónica**

Dada a morosidade da análise das amostras para estudos quantitativos e qualitativos do fitoplâncton, o grupo de fitoplâncton do projeto EEMA decidiu, já que para este fim se previa estudar cerca de 1/3 das amostras de clorofila *a*, estabelecer um critério para caracterizar os máximos de fitoplâncton nas águas costeiras e de transição. A seleção de amostras a estudar, cerca de 1/3 das de clorofila *a*, deverá ser realizada com base:

- (vii) na concentração da clorofila *a*. Devem seleccionar-se, para caracterização taxonómica, as amostras correspondentes aos máximos de clorofila *a*
- (viii) na cobertura, tanto quanto possível, das várias massas de água envolvidas na zona costeira, independentemente da condição de maré.