

MATERIAL SUPLEMENTAR A3MFS1

FITOPLÂNCTON

SUMÁRIO

1. METODOLOGIA DE COLETA E ANÁLISE	2
1.1 ALTERAÇÕES METODOLÓGICAS NA COLETA DE FITOPLÂNCTON PARA O ANO 2	4
2. REFERÊNCIAS	6

1. METODOLOGIA DE COLETA E ANÁLISE

As amostras do fitoplâncton na área de estudo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental (PMBA/Fest-RRDM), foram coletadas em superfície e próximo do fundo conjuntamente com as amostragens para determinação das variáveis químicas. Estas amostras foram submetidas a análises quantitativas e qualitativas e à quantificação da concentração de clorofila-a e feopigmentos em laboratório, bem como a determinação da clorofila ativa.

As amostragens quantitativas foram realizadas com o uso de garrafa oceanográfica e fixadas com solução formalina a 2% neutralizada com hexametilenotetramina. A contagem do fitoplâncton foi realizada utilizando-se câmara de sedimentação de Uthermöhl (UTHERMÖHL, 1958) em microscópio invertido, após um tempo mínimo de 24 horas de sedimentação. O procedimento de contagem escolhido foi o dos campos aleatórios, descrito por UEHLINGER (1964). As coordenadas dos campos foram geradas por programa de computador e os campos então, foram localizados na platina do microscópio. Para cada contagem foi gerado um sistema de campos aleatórios diferente. O critério utilizado para determinação do número de campos a serem contados é o que procura alcançar 100 indivíduos da Espécie mais abundante. De acordo com LUND, KIPLING e LE CREN (1958), isto permite trabalhar com intervalos de confiança de $\pm 20\%$ da média, a um nível de significância de 95%, o que é considerado como suficiente para estudos dessa natureza.

As amostras para análise qualitativa foram coletadas através de arrastos verticais com o uso de rede de plâncton com malha de 60 μm de abertura, à baixa velocidade, na superfície das estações amostrais e foram separadas em dois grupos: amostras fixadas com soluções de formalina a 2% e amostras fixadas com solução de lugol neutro. Em laboratório foi empregado o uso de microscópio biológico óptico, equipado com câmera USB para registros de imagens e ocular de medição. Os organismos foram esquematizados e identificados, analisando-se as suas características morfológicas e morfométricas e utilizando-se bibliografia especializada. Os nomes científicos das Espécies encontradas nas amostras foram consultados junto ao banco de dados internacional ALGAEBASE (<http://www.algaebase.org/>).

Os resultados foram expressos em indivíduos por ml (densidade de organismos), conforme Equação 1 demonstrada adiante:

$$N = n \times A \times 1 V \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

N = Número de organismos por ml

n = número de organismos contados

a = Área contada

A = Área total da câmara

V = Volume total sedimentado

Os organismos foram classificados em duas frações de tamanho durante as contagens: nanofitoplâncton (2-19 µm) e microfitoplâncton (20-200 µm). Os índices de diversidade específica ($\text{bits} \cdot \text{organismo}^{-1}$) foram calculados a partir dos valores de densidade numérica do fitoplâncton, conforme o método proposto por SHANNON e WEAVER (1963). Tal índice fornecerá uma medida do grau médio de incerteza em predizer que Espécies e indivíduos serão escolhidos aleatoriamente de um total de S Espécies e N indivíduos (DAJOZ, 1973). MARGALEF (1976) ressalta que em comunidades naturais, os valores numéricos do índice de diversidade de Shannon-Weaver raramente excedem 5 bits (unidade de medida de H, sem dimensões vinculadas) por indivíduo. Ademais, a diversidade em comunidades fitoplanctônicas, em bits por célula, está normalmente entre 1 e 2,5 em águas costeiras e entre 3,5 e 4,5 em águas oceânicas.

A equabilidade das Espécies foi obtida através da expressão de PIELOU (1977; 1966), cujos valores se enquadram entre 0 e 1, sendo considerado alto ou equitativo os índices superiores a 0,50, o qual representa uma distribuição uniforme dos táxons na amostra analisada. Logo, quanto mais igualmente distribuído estiver o total de indivíduos nas n Espécies, maiores serão a equabilidade e a diversidade.

As amostras de clorofila-a e feopigmentos foram analisadas por réplicas, tendo como resultado final uma média entre estas. As análises de clorofila-a e feopigmentos foram realizadas seguindo-se os métodos descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater da APHA/AWWA/WEF (2005), enquanto a determinação espectrofotométrica da concentração de pigmentos fotossintéticos foi obtida através das duas equações monocromáticas de LORENZEN (1967). Além disso, a clorofila ativa (%) foi estimada a partir da razão dos valores de clorofila-a pela concentração total de pigmentos (clorofila-a e feopigmentos).

Além da coleta de amostras de água realizou-se a amostragem da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), onde os equipamentos Li Cor hidro radiômetro, acoplado a uma gaiola junto com a sonda YSI EXO 2, realizaram perfilagens conjuntas, capturando dados na mesma frequência (1Hz). Através dos dados de RFA obtidos pelo hidro radiômetro (que não possui profundímetro) e os dados de profundidade obtidos pela Sonda YSI EXO 2, foram calculados perfis de RFA, fração de radiação incidente (%) para cada profundidade de coleta (superfície, meio e fundo), e também calculado o coeficiente vertical de atenuação da luz – Kd (RFA) (KIRK, 1986), através das fórmulas abaixo:

$$(\%) \text{ radiação incidente} = \frac{(RFA_1 \cdot 100)}{RFA_0} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

RFA_1 é a RFA aferida a determinada profundidade;

RFA_0 é a RFA aferida em subsuperfície (assim que o equipamento é imerso na água);

$$Kd(RFA) = \frac{\ln(I_0) - \ln(I_1)}{z} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: I_0 é a RFA aferida na subsuperfície;

Z_1 é a RFA aferida na profundidade para a qual se deseja calcular o $Kd(RFA)$;

e z é a profundidade em metros (m) para a qual se deseja calcular o $Kd(RFA)$.

Foram feitas médias dos valores de meio e fundo (uma vez que Kd não se aplica a superfície), que foram plotadas espacialmente no programa ODV (*Ocean Data View*).

1.1 ALTERAÇÕES METODOLÓGICAS NA COLETA DE FITOPLÂNCTON PARA O ANO 2

Algumas alterações metodológicas foram feitas nas coletas de fitoplâncton estuarino e marinho para o Ano 2 do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental (PMBA/Fest-RRDM). Dentre as mudanças teve-se a supressão da coleta do meio da coluna d'água para as análises quantitativas e de pigmentos, enquanto continuou-se o procedimento de coleta adotado para as profundidades de superfície e fundo da coluna d'água. Outra alteração metodológica foi a redução dos volumes filtrados e coletados para as análises quantitativas no Setor Abrolhos, reduzindo o volume filtrado das amostras de pigmentos de dois litros (2L) por réplica para um litro (1L), e a redução no volume coletado das amostras quantitativas em Abrolhos de um litro (1L) para 250 ml, seguindo o mesmo protocolo de coleta aplicado para os outros setores. Além disso, a sonda YSI EXO2 passou a ser lançada como unidade *stand alone* (sem cabo e *handheld*), devido à utilização do cabo aumentar o risco de incidentes, como o ocorrido em abril de 2019 na estação ABR 02, onde o cabo acabou por se prender ao fundo exigindo grande manobra para a recuperação do equipamento que sofreu alguns danos como consequência.

Tais alterações foram realizadas pois, a princípio, acreditava-se que dados químicos da profundidade de meio seriam coletados, o que possibilitaria conhecer outros parâmetros sobre as amostras nesta profundidade para, desta forma, cruzá-los com os resultados quantitativos e de biomassa da comunidade fitoplanctônica. Em suma, as amostragens de dados de parâmetros químicos do meio da coluna d'água não existiram, bem como não houve tempo hábil para as análises quantitativas de fitoplâncton das amostras coletadas nessa profundidade, e não foi permitido aumento da equipe de pesquisadores para o Ano 2 do PMBA/Fest-RRDM. Portanto, as coletas de meio foram suprimidas para o segundo ano, ao passo que se manteve a amostragem de dados de clorofila total através do fluorímetro *Aquaflash*, sem acarretar prejuízo aos resultados do monitoramento do fitoplâncton, principalmente porque a maioria das estações é rasa.

Para o Ano 2 do PMBA/Fest-RRDM também foram inseridas nas análises as estimativas de Eficiência Fotossintética (diferença entre fluorescência máxima e mínima), obtidas através do fluorímetro Aquaflash com metodologia já descrita anteriormente.

Quanto à redução dos volumes de água para Abrolhos, a decisão foi tomada após as primeiras análises demonstrarem que o ambiente não era tão oligotrófico como se pressupôs de início, tornando onerosa e desnecessária a filtragem de um volume de água maior para as estações desse Setor. Analogamente, o mesmo ocorreu no procedimento de sedimentação das amostras para a contagem de organismos fitoplanctônicos, que exigiu diluição das alíquotas após a sedimentação de um litro, demonstrando que este volume impossibilitava a contagem de organismos, assim como acarretava retrabalho e perda de tempo e material.

2. REFERÊNCIAS

- APHA. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, **21st ed.** Washington, 2005.
- DAJOZ, R. Ecologia Geral. São Paulo, **Vozes.** 472p.,1973.
- KIRK, J. T. O. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. **Cambridge University Press**, 401p. 1986.
- LORENZEN, C.J. Determination of chlorophyll and pheopigments: Spectrophotometric equations. **Limnol. Oceanogr.**, v.12, p.343-346, 1967.
- LUND J. W. G.; KIPLING, C. R., LENCREN, E.D. The inverted microscope method of estimating alga number and statistical basis of estimating by counting. **Hydrobiologia**, v.11, p. 143- 170, 1958.
- MARGALEF, R. Diversity. In: SOURNIA, A. (Ed.). Phytoplankton manual. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle. **UNESCO**, 1976.
- PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. **Journal of Theoretical Biology**, v.13, p.131-144, 1966.
- PIELOU, E. C. Mathematical ecology. **New York: Wiley.** 1977.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The mathematical theory of communication. Illinois. **University Press. Urbana**, 1963.
- UEHLINGER, V. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. **Arch. Sci.** v. 17, n.2, p.121–123, 1964.
- UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton – methodik. Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. **Limnol.**, v.9, p. 1–38. 1958.