

# Implementação de um Ensaio Piloto para Identificação e Quantificação de Fitoplâncton no âmbito Avaliação Externa da Qualidade



Ana Paula Faria<sup>1,a</sup>, Helena Correia<sup>1</sup>, Cristina Brito<sup>1</sup>, Vera Clemente<sup>1</sup>, Ana Cardoso<sup>1</sup>, Susana Silva<sup>1</sup>, Sérgio Paulino<sup>3,b</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Epidemiologia, Unidade de Avaliação Externa da Qualidade;

<sup>2</sup> Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Saúde Ambiental, Laboratório de Biologia e Ecotoxicologia;

<sup>a</sup> Correspondência operacional do programa PNAEQ – [pnaeq@insa.min-saude.pt](mailto:pnaeq@insa.min-saude.pt)

<sup>b</sup> Correspondência científica – [sergio.paulino@insa.min-saude.pt](mailto:sergio.paulino@insa.min-saude.pt)

## Introdução e Objetivo

O Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade, implementou em 2015 um ensaio piloto no âmbito da identificação e quantificação de fitoplâncton. O fitoplâncton é um importante indicador de qualidade biológica utilizado na classificação do estado ecológico de rios e lagos, e do potencial ecológico e risco toxicológico de massas de água doce fortemente modificadas como as albufeiras.

O objetivo consistiu na **implementação de um ensaio para identificação e quantificação de fitoplâncton**, requisito para a acreditação dos laboratórios.

## Métodos

Para realizar o levantamento das diferentes realidades dos laboratórios, nomeadamente metodologias de rotina, nomenclatura e identificação das espécies de fitoplâncton, foi constituído um grupo de trabalho que colaborou na implementação do ensaio piloto.

No ensaio piloto, participaram 5 laboratórios que receberam uma amostra de água bruta fixada com lugol, adequada à identificação e contagem do número total de organismos fitoplanctónicos pertencentes a cada táxon. Solicitou-se a análise em paralelo pelo procedimento em rotina no laboratório e pela quantificação em dois transectos numa câmara de 5 mL, sem diluição, sendo os resultados expressos em número de células e densidade. A identificação dos organismos deveria ser efetuada até à espécie.

## Resultados

Após uma primeira análise dos resultados verificou-se uma grande **variabilidade** nos **métodos de rotina** utilizados pelos laboratórios para a quantificação e a **identificação dos microrganismos**. Para contornar essa variabilidade, o tratamento estatístico efetuado incidiu apenas nos resultados reportados com o método de contagem por transectos e câmara de sedimentação de 5 mL.

O tratamento estatístico considerou apenas os microrganismos cujos resultados de densidades foram obtidos por 3 ou mais participantes, desde que mais do que 50% dos dados não fossem semelhantes. Para uma maior robustez da análise os dados foram agregados por classes à exceção das cianobactérias (**tabela 1**). Não foram considerados os 76 microrganismos cujas identificações foram feitas por apenas 1 ou 2 participantes.

O valor de consenso foi determinado através dos dados dos participantes pela aplicação do Algoritmo A e de acordo com o ponto 5.6 da ISO 13528:2005 (*Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*).

**Tabela 1:** Alvos obtidos da densidade para os microrganismos identificados por pelo menos 3 participantes

Microrganismo	Alvo	Incerteza
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	1621	349,2
Criptófitas TODAS	2665	491,6
<i>Cryptomonas curvata</i>	109,6	86,5
<i>Cryptomonas marssonii</i>	59,0	35,9
<i>Cryptomonas obovata</i>	109,0	60,0
<i>Cryptomonas ovata</i>	121,8	51,1
<i>Komma caudata</i>	1123	682,8
<i>Plagioselmis nannoplanctica</i>	1159	975,1
Outra Criptófita	107,3	47,4
Diatomáceas TODAS	1116	282,0
<i>Asterionella formosa</i>	49,3	18,2
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>granulata</i>	178,9	131,7
<i>Fragilaria crotonensis</i>	688,2	259,4
Outras Diatomáceas	29,7	27,4
Clorófitas TODAS	1989	376,2
<i>Chlamydomonas globosa</i>	95,3	41,0
<i>Coelastrum microporum</i>	54,7	40,0
<i>Coelastrum astroideum</i>	213,9	140,4
<i>Desmodesmus intermedius</i>	32,2	2,8
<i>Eudorina unicocca</i>	1062	181,9
<i>Micractinium pusillum</i>	128,3	53,7
<i>Monoraphidium contortum</i>	13,6	2,9
<i>Pandorina morum</i>	309,2	132,1
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	32,3	15,5
<i>Sphaerocystis Schroeteri</i>	123,0	60,6
Outra Clorófita	91,5	56,6
Dinoflagelados TODAS	16,1	3,0
Euglenófitas TODAS	9,7	5,9

Os resultados obtidos estatisticamente, para os dados de quantificação (densidade), foram compilados num relatório individual sendo apresentados em forma de tabela, com discriminação de para cada microrganismo identificado pelo laboratório conforme a **tabela 2**.

A representação gráfica dos resultados foi feita através de histogramas para cada microrganismo identificado (**imagem 1**). Nos histogramas cada laboratório pode observar a frequência dos resultados enviados, com identificação do resultado enviado pelo laboratório (linha a tracejado) e o alvo (linha a cheio).

Verificou-se que 96,4% dos resultados apresentaram um z-score inferior a | 2 |.

**Tabela 2:** Exemplo da tabela com resultados estatísticos incorporada no relatório individual de cada participante

	1	2	3	4	5	6	7	8
	Resultado	ID/Score	Viés	Apreciação	Alvo	Incerteza	N Resp	Condições ensaio
<i>Dolichospermum flos-aquae</i>	1862	0.33	240.56	Excelente	1621.44	349.24	7	C02-M01
<i>Cryptomonas marssonii</i>	48	-0.19	-11.02	Excelente	59.02	35.85	4	C02-M01
<i>Cryptomonas obovata</i>	214	1.09	105.00	Bom	109.00	59.96	4	C02-M01
<i>Cryptomonas ovata</i>	90	-0.39	-31.75	Excelente	121.75	51.13	4	C02-M01
<i>Komma caudata</i>	2552	1.17	1429.00	Bom	1123.00	682.77	5	C02-M01
<i>Plagioselmis nannoplanctica</i>	5	-0.85	-1154.00	Bom	1159.00	975.15	3	C02-M01
Criptófitas TODAS	3315	0.58	650.19	Bom	2664.81	491.61	8	C02-M01
<i>Asterionella formosa</i>	62	0.33	12.69	Excelente	49.31	18.20	7	C02-M01
<i>Aulacoseira granulata</i> var. <i>granulata</i>	124	-0.26	-54.85	Excelente	178.85	131.69	4	C02-M01
<i>Fragilaria crotonensis</i>	386	-0.51	-302.18	Bom	688.18	259.38	8	C02-M01
Diatomáceas TODAS	1402	0.45	286.10	Excelente	1115.90	282.00	8	C02-M01
<i>Chlamydomonas globosa</i>	100	0.08	4.67	Excelente	95.33	41.03	3	C02-M01
<i>Coelastrum astroideum</i>	152	-0.32	-61.93	Excelente	213.93	140.44	3	C02-M01
<i>Coelastrum microporum</i>	14	-0.73	-40.67	Bom	54.67	40.04	3	C02-M01
<i>Eudorina unicocca</i>	1162	0.31	100.00	Excelente	1062.00	181.90	5	C02-M01
<i>Micractinium pusillum</i>	229	1.17	100.75	Bom	128.25	53.73	4	C02-M01
<i>Monoraphidium contortum</i>	19	0.96	5.45	Bom	13.55	2.91	6	C02-M01
<i>Pandorina morum</i>	81	-0.88	-228.24	Bom	309.24	132.08	6	C02-M01
<i>Sphaerocystis Schroeteri</i>	248	1.29	125.00	Bom	123.00	60.60	4	C02-M01
Clorófitas TODAS	2463	0.56	473.59	Bom	1989.41	376.25	8	C02-M01
Dinoflagelados TODAS	20	0.72	3.92	Bom	16.08	3.03	5	C02-M01

1 – Resultado: Resultado obtido pelo laboratório na quantificação do microrganismo

2 – ID/Score: Índice de desvio/z-score obtido através da fórmula  $ID/Score = \frac{(x_i - \bar{x})}{s}$

3 – Viés: Diferença entre o valor do laboratório e o valor alvo

4 – Apreciação: Definida qualitativamente através do valor do z-score (ID/Score) consoante a tabela

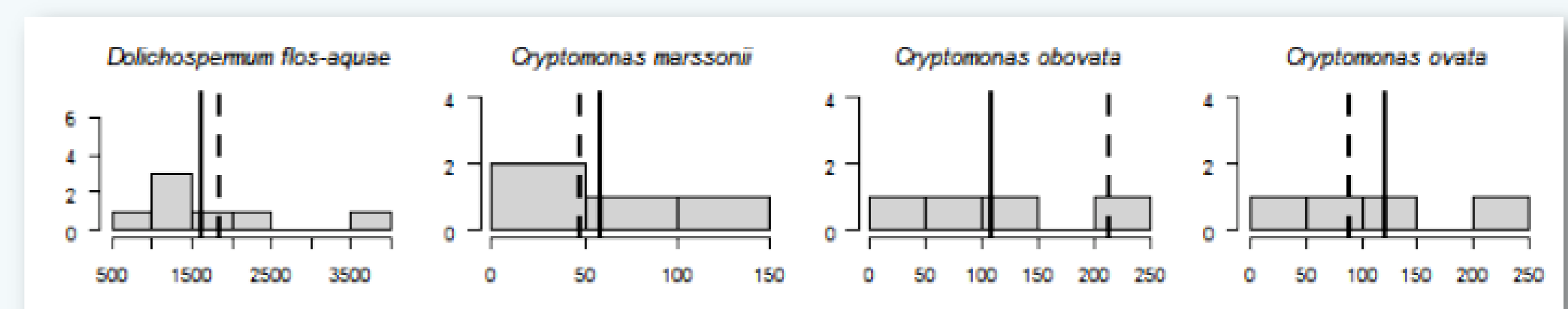
5 – Alvo: Valor de consenso calculado através do Algoritmo A

6 – Incerteza: Incerteza associada ao alvo

7 – N Resp: Número total de respostas recebidas para cada parâmetro

8 – Condições Ensaio: Método para qual é efetuado o tratamento estatístico

Apreciação	
Excelentes	0 < ID < 0,5
Bons	0,5 < ID < 2,0
Satisfatórios	2,0 < ID < 3,0
Insatisfatórios se	ID > 3,0



**Imagem 1:** Exemplo da componente gráfica incorporada no relatório individual de cada participante, em que a linha a tracejado representa o resultado reportado pelo participante e a linha a cheio o valor alvo

## Conclusões

O ensaio piloto revelou a não harmonização de metodologia implementada nos laboratórios, com consequente variabilidade de resultados.

Verificou-se a identificação de uma gama alargada de microrganismos.

O grupo de trabalho irá limitar a identificação e quantificação a 6 microrganismos previamente definidos.

A quantificação será efetuada através do método de contagem por transectos e câmara de sedimentação de 5 mL para que os resultados dos laboratórios sejam comparáveis, enquanto que a identificação de fitoplâncton será efetuada pela análise de fotografias e vídeos.

O grupo de trabalho contribuirá para a implementação do Programa de AEQ em Fitoplâncton integrado no PNAEQ.