

MARIA JOÃO FEIO
VERÓNICA FERREIRA
(EDS.)

IMPRESA DA
UNIVERSIDADE
DE COIMBRA
COIMBRA
UNIVERSITY
PRESS

RIOS DE PORTUGAL

COMUNIDADES,
PROCESSOS E ALTERAÇÕES

CAPÍTULO 4

ALGAS

**Salomé F.P. Almeida¹, Ana T. Luís², Carmen L. Elias³, Maria Helena Novais⁴,
Lília M.A. Santos⁵, Vítor Vasconcelos⁶, Sandra C. Craveiro⁷ & António J. Calado⁸**

¹GeoBioTec – Unidade de Investigação Geobiociências, Geotecnologias e Geoengenharias, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal, salmeida@ua.pt

²GeoBioTec – Unidade de Investigação Geobiociências, Geotecnologias e Geoengenharias, Departamento de Geociências, Universidade de Aveiro, Portugal, anatluís@ua.pt

³GeoBioTec – Unidade de Investigação Geobiociências, Geotecnologias e Geoengenharias, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal, carmen.elias@ua.pt

⁴ICT – Instituto Ciências da Terra, Universidade de Évora, Portugal, novaismh@gmail.com

⁵Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Portugal, liliamas@ci.uc.pt

⁶CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Portugal, vmvascon@fc.uc.pt

⁷GeoBioTec – Unidade de Investigação Geobiociências, Geotecnologias e Geoengenharias, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal, scraveiro@ua.pt

⁸GeoBioTec – Unidade de Investigação Geobiociências, Geotecnologias e Geoengenharias, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Portugal, acalado@ua.pt

Resumo: O termo algas engloba grupos de organismos muito diferentes entre si apresentando uma distribuição geográfica global muito ampla. Sendo geralmente fotossintéticas constituem a base do funcionamento de muitos ecossistemas aquáticos. Neste trabalho incidir-se-á sobre as algas de água doce que ocorrem em ambientes lóticos e destas apenas serão destacados os grupos dominantes, ubíquos, ecologicamente relevantes ou que foram alvo de extensa investigação a nível nacional, sendo eles: as cianobac-

térias, os dinoflagelados e as diatomáceas. Sumariou-se ainda a investigação que tem sido desenvolvida em Portugal, destacando-se a diversidade de abordagens (p.ex., morfológica, taxonómica, ecológica, filogenética, molecular, toxicológica e biotecnológica).

Palavras-chave: algas, cianobactérias, diatomáceas, dinoflagelados, rios

1. Algas nos rios

O termo algas reúne um conjunto diversificado de organismos geralmente fotossintéticos, e muitas vezes estruturalmente mais simples do que as plantas¹. No entanto, esta definição não inclui todas as algas, uma vez que algumas perderam a sua capacidade fotossintética e são heterotróficas, outras são mixotróficas como é o caso, por exemplo, de representantes das Euglenophyta e das Dinophyta. Algumas Phaeophyceae (algas castanhas) apresentam um grau de complexidade estrutural próximo do das plantas vasculares. Do ponto de vista morfológico as algas são muito diversificadas: podem ser unicelulares, coloniais, imóveis ou móveis por flagelos ou por movimentos amebóides, filamentosas com e sem ramificações, filamentosas uni ou plurisseriadas, com estrutura parcialmente cenocítica (apocíticas, organismo constituído por apócitos que são células separadas entre si por septos e que contém mais que um núcleo), ou totalmente cenocítica (organismo constituído por uma única célula multinucleada sem septos), pseudoparenquimatosas entre outros, o que implica que em termos de dimensões possam ir desde alguns micrómetros (p.ex., *Chlamydomonas*) a dezenas de metros de comprimento (p.ex., *Macrocystis*). As Cyanophyta ou Cyanobacteria embora procarióticas (células sem organelos envoltos por membranas, i.e., ADN e tilacóides estão dispersos pelo citoplasma) são estudadas pelos ficologistas devido à sua diversidade morfológica tão complexa como a encontrada

em algas eucarióticas (células ou organismos que possuem organelos delimitados por membranas, i.e., núcleo, mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, complexo de Golgi) para além de serem fotossintéticas com produção de oxigénio. As restantes algas são eucarióticas e delas fazem parte grupos de organismos que diferem muito entre si em numerosos aspetos (morfologia, citologia, ultraestrutura, reprodução, fisiologia, bioquímica, genética) o que indica uma proveniência a partir de diversos tipos ancestrais². Apesar da origem polifilética, todas as algas fotossintéticas possuem clorofila *a*, embora possam variar na presença de clorofila *b*, *c* ou *d*. Outros pigmentos acessórios como ficobilinas ou xantofilas podem camuflar a cor verde da clorofila tornando as algas mais ou menos avermelhadas (Rhodophyta), azuladas (Cyanobacteria), acastanhadas ou mesmo douradas (Phaeophyceae, Chrysophyceae, Bacillariophyceae). A composição química das paredes celulares assim como as substâncias de reserva podem variar entre diferentes grupos de algas. A diversidade torna-se ainda maior ao considerarem-se características ultraestruturais, como por exemplo o número de membranas que rodeia os cloroplastos (organelo que contém clorofila sendo responsável pela fotossíntese), a arquitetura flagelar de organismos móveis, os mecanismos de divisão celular, entre outros².

Os grupos taxonómicos com maior representatividade nas águas correntes, quer em termos de diversidade, quer em termos de abundância, são as Bacillariophyceae (diatomáceas) e as Chlorophyta (algas verdes), mas também as Cyanobacteria (algas azuis). Em zonas de menor velocidade de corrente onde o desenvolvimento de fitoplâncton é possível, poderão abundar os grupos referidos anteriormente acrescidos de Euglenophyta e Chrysophyceae. Outros grupos menos frequentes e geralmente pouco abundantes poderão também ocorrer nos rios, como é caso das Dinophyta, Cryptophyta, Eustigmatophyceae, Rhodophyta (algas vermelhas) e Phaeophyceae. Estes dois últimos grupos são maioritariamente marinhos estando representados por um pequeno número de géneros em meios lóticos³.

2. Habitats e importância ecológica das algas

As algas apresentam uma distribuição geográfica muito ampla a nível global³. Embora maioritariamente aquáticas, podem ocorrer também em escorrências, solos, superfície de gelo, troncos de árvores, entre outros. As algas conseguem desenvolver-se em meios marinhos, salobros, de água doce e até em ambientes extremos como é o caso das drenagens ácidas de minas. Podem desenvolver-se na coluna de água (planctónicas), mas também colonizam todo o tipo de substratos disponíveis (perifíticas), como é caso de rochas e pedras (epilíticas), sedimento arenoso (epipsâmicas), sedimento vasoso (epipélicas), outras algas e plantas (epifíticas) e até animais (epizóicas), sobretudo em rios e ribeiros pouco profundos ou na zona litoral de lagos⁴. Nos grandes rios e em troços onde ocorrem albufeiras, as algas planctónicas poderão desenvolver comunidades expressivas⁵. As algas planctónicas apresentam uma sucessão sazonal de espécies bem definida, especialmente em lagos temperados¹. No caso de meios lóticos de pequenas dimensões são as algas perifíticas as dominantes. As algas planctónicas (fitoplâncton) e perifíticas (perifíton) ocorrem em equilíbrio dinâmico com o balanço a depender da profundidade da água e da velocidade da corrente¹. O desenvolvimento de fitoplâncton depende de uma baixa velocidade da corrente o que implica um tempo suficiente de residência da água (caso contrário é arrastado para jusante) e níveis de luz adequados, daí ser dominante à superfície de lagos e em águas com fraca corrente. Por outro lado, o perifíton requer níveis adequados de luz (água transparente, pouco profunda), substratos para adesão podendo tolerar elevada velocidade de corrente e predominando em rios e ribeiros¹. É comum observar-se um intercâmbio de algas entre habitats, como por exemplo, o desprendimento de algas do substrato a que estão aderentes e a sua passagem à coluna de água durante um período de tempo, ou a sedimentação de algas planctónicas nos substratos disponíveis.

As algas estando na base das teias tróficas e ciclos biogeoquímicos constituem um componente importante dos ecossistemas aquáticos⁶. As algas do fitoplâncton e do perifíton de rios e ribeiros são importantes produtores primários, constituindo uma fonte essencial de alimento para os consumidores primários. Ao fotossintetizarem, as algas transformam o fósforo e azoto inorgânicos em orgânicos acumulando-os na sua biomassa e regulando assim o balanço químico destes e de outros nutrientes nos ambientes aquáticos. No entanto, em determinadas condições ambientais estas podem desenvolver-se de forma maciça ameaçando o equilíbrio ecológico e comprometendo os bens e serviços dos ecossistemas⁶. Por outro lado, as algas podem ser usadas para avaliar bens e serviços dos ecossistemas como indicadores de alterações da qualidade dos meios aquáticos (físicas, químicas, de habitat) devido às suas respostas diferenciadas⁶. Ao perifíton é também reconhecida a capacidade de estabilização de substratos, como da areia ou de outros sedimentos soltos, impedindo a sua desagregação por ação da corrente⁴, e de servir de habitat para muitos outros organismos como quironómídeos, anfípodes e meiofauna.

3. Tipos de algas mais frequentes/abundantes em rios

3.1. Cianobactérias

3.1.1. Citologia e diversidade morfológica

As cianobactérias, classificadas como algas azuis até às últimas décadas do século XX, são organismos procarióticos fotossintéticos que apresentam uma grande ubiquidade, vivendo desde as zonas tropicais até à Antártida e ao Ártico, nos desertos e nascentes termais, em águas doces e salgadas, de vida livre ou em simbiose com fungos

(líquenes), esponjas, corais, plantas terrestres (*Cycas* spp.) e inclusive com animais (preguiça). São organismos com uma história evolutiva longa, existindo desde há mais de 3,5 mil milhões de anos, responsáveis pela produção de uma atmosfera rica em oxigénio no nosso planeta já que foram os primeiros organismos fotossintéticos a colonizar os nossos mares. Estiveram ainda na origem dos cloroplastos das algas e plantas superiores. Sendo procariontes têm uma estrutura celular muito simples, sem verdadeiros organelos, possuindo ADN na matriz citoplasmática e a clorofila associada a tilacóides.

As cianobactérias possuem uma morfologia simples, com células esféricas ou ovóides, no caso de espécies unicelulares ou coloniais, e células cilíndricas no caso das espécies filamentosas. Os filamentos podem ser simples ou ramificados e possuem células vegetativas ou, em algumas ordens como as Nostocales, células especializadas como os heterocistos (onde se dá a fixação de azoto atmosférico) ou acinetos (células de resistência).

3.1.2. Papel como indicadores

Embora as cianobactérias sejam ubíquas, podem em situações de excesso de nutrientes – eutrofização – tornarem-se dominantes em relação a outras espécies de fitoplâncton ou de perifíton e formarem explosões populacionais – florescências ou *blooms*. As florescências de cianobactérias, mais visíveis em águas com pouca corrente, como nas albufeiras ou lagos naturais ou artificiais, são assim indicadores de um estado de eutrofização avançado, refletindo o excesso de azoto e/ou fósforo na água (Figura 4.1). Em sistemas de águas correntes de pouca profundidade (rios não represados), ou em zonas de estuários e em zonas costeiras marinhas, as cianobactérias podem também formar tapetes extensos, que podem dominar os grupos de microalgas. Durante as florescências podemos assistir a uma mudança na dominância das

espécies de cianobactérias presentes, passando por exemplo de organismos da ordem Chroococcales para a Nostocales, o que nos indicará uma deficiência de azoto, já que estas últimas são fixadoras de azoto e surgem por isso em maior abundância quando este está deficitário.



Figura 4.1. Florescência de cianobactérias no rio Douro (albufeira de Crestuma-Lever) em setembro de 1996. Fotografia: Vítor Vasconcelos.

Em Portugal, os estudos sobre cianobactérias tiveram início no começo do século XX com os estudos de Sampaio⁷ focando-se nesta fase na sistemática de cianobactérias de águas doces e salobras. Na década de 1990 começaram a produzir-se trabalhos nas áreas da toxicidade de cianobactérias e da sua ocorrência em rios, lagos e albufeiras e suas implicações em termos de saúde humana e ambiental⁸.

3.1.3. Biodiversidade e toxicidade de cianobactérias

Os estudos sobre cianobactérias nos rios portugueses têm sido focados mais nas comunidades planctónicas de albufeiras, em rios

com corrente reduzida e ainda em estuários. As cianobactérias podem produzir toxinas (cianotoxinas) que causam impactos significativos nos sistemas aquáticos, causando mortes maciças de peixes e aves aquáticas, podendo também causar a morte a mamíferos que consomem águas contaminadas, como animais domésticos e gado. O consumo de água ou alimentos contaminados com toxinas, contacto direto aquando de atividades recreativas ou por tratamento com diálise resulta em intoxicações humanas, por vezes letais. As cianotoxinas podem ter efeitos neurotóxicos (anatoxina-a, saxitoxinas, β -N-metilamino-l-alanina (BMAA)), hepatotóxicos (microcistinas e nodularinas), citotóxicos (cylindrospermopsina) ou dermatotóxicos (lipopolissacarídeos).

Nos rios portugueses, as primeiras toxinas a serem detetadas foram as microcistinas⁹. Ocorrem em especial em albufeiras (p.ex., Torrão, Aguieira, Crestuma, Monte Novo, Alqueva), mas também em troços de rios não represados e seus estuários (p.ex., Minho, Guadiana), podendo revelar-se um problema de saúde pública dada a sua potencial acumulação em bivalves nesses locais. As espécies dominantes no plâncton de rios represados são *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Dolichospermum (Anabaena) flos-aquae*¹⁰. A sua ocorrência em praias fluviais também pode limitar os usos desses locais, sendo aconselhado a colocação de placas e outro material informativo aquando da ocorrência de florescências de cianobactérias.

3.1.4. Biotecnologia e cianobactérias

Recentemente têm sido realizados estudos que indicam o potencial biotecnológico das cianobactérias, como fontes de proteínas para rações animais, suplementos alimentares para humanos, e inclusivamente aplicações na cosmética e na indústria farmacêutica. Entre estes podemos salientar as aplicações na área dos antibióticos, anti-víricos¹¹, anticancerígenos¹², antiobesidade¹³, alelopatia¹⁴ e anti-incrustantes¹⁵.

A possibilidade de isolar estirpes de cianobactérias e cultivá-las em laboratório em condições controladas potencia o seu uso de uma forma sustentada, sem necessidade de recolha de biomassa no meio ambiente natural. As coleções de culturas, como a LEGE CC (<http://lege.ciimar.up.pt/>) existente no CIIMAR (Universidade do Porto), são excelentes acervos de biodiversidade que devem ser consolidadas e conhecidas, de forma a aumentar o sucesso na busca de novos bioativos de origem algal e cianobacteriana em particular¹⁶. Na Algoteca da Universidade de Coimbra (ACOI) encontra-se uma das mais extensas coleções de cianobactérias mas também de outras microalgas de água doce que representa de forma significativa a diversidade algológica Portuguesa (<http://acoi.ci.uc.pt/>). São cerca de 4000 culturas vivas que foram isoladas de uma vasta gama de habitats em Portugal, incluindo rios e albufeiras. As culturas ACOI são solicitadas por instituições de ensino nacionais e internacionais e também por empresas de vários países.

3.2. Dinophyceae (dinoflagelados)

3.2.1. Citologia e diversidade morfológica

Os dinoflagelados são um grupo de algas muito diversificado, caracterizado por um conjunto de particularidades bem distintas. Cerca de metade das espécies do grupo tem capacidade fotossintética, as outras são heterotróficas e têm que utilizar partículas orgânicas, frequentemente outros organismos, como fonte de carbono; algumas espécies providas de cloroplastos também consomem presas e são designadas mixotróficas. Os dinoflagelados constituem um dos mais importantes grupos de algas em meio marinho, onde atingem maior diversidade. A grande maioria das formas encontradas em águas interiores são células solitárias dotadas de mobilidade através da atividade de dois

flagelos diferentes (projeção celular alongada e cilíndrica com uma ultra-estrutura característica formada por 9 pares de microtúbulos à periferia e 2 microtúbulos centrais, salvo raras exceções em podem faltar os 2 microtúbulos centrais) que se inserem na zona ventral da célula (Figura 4.2a). Um dos flagelos tem a estrutura de uma "fita" que ondula dentro de uma goteira transversal (cíngulo), demarcando na célula uma zona anterior (epicone ou epissoma) e uma zona posterior (hipocone ou hipossoma). O outro flagelo é aproximadamente cilíndrico e estende-se geralmente numa depressão longitudinal (sulco), prolongando-se para lá da célula, no sentido oposto ao deslocamento (Figura 4.2a). As Figuras 4.2b-f ilustram em microscopia óptica variantes morfológicas comuns em água doce. Em algumas espécies a forma vegetativa é cocóide (células não flageladas, rodeadas de parede) e é geralmente aderente a outros organismos (Figura 4.2d); nestas formas as células móveis ocorrem apenas como agentes de reprodução e dispersão. Todas as células móveis de dinoflagelados apresentam uma organização particular da periferia que se denomina anfiesma. Em geral, o anfiesma é formado pela membrana celular (plasmalema) e por uma camada subjacente de vesículas achatadas (Figura 4.2a). As vesículas do anfiesma podem conter placas celulósicas mais ou menos espessas (Figura 4.2b), formando no seu conjunto uma espécie de armadura articulada (teca); noutras formas, ditas nuas, as vesículas do anfiesma não apresentam material consistente. O número e disposição das placas tecais na superfície da célula têm sido usados na caracterização taxonómica. Vários sistemas de numeração e identificação das placas têm sido estabelecidos, mas o sistema de Kofoid¹⁷, em que as placas são identificadas pela sua distribuição em fiadas transversais na célula, é o mais usado. O núcleo dos dinoflagelados é geralmente volumoso e facilmente reconhecível em microscopia óptica por ter os cromossomas permanentemente condensados (Figura 4.2f).

A morfologia das células de dinoflagelados é fortemente marcada pela posição do cíngulo, que varia ao longo do eixo longitudinal. As

formas mais frequentes apresentam o cingulo perto do meio da célula (p.ex., *Borghiella* spp., Figura 4.2a, f), outras têm-no perto da zona apical, delimitando um epicone pequeno (p.ex., *Prosoaulax* spp., Figura 4.2c), noutras ainda o cingulo insere-se perto da zona antapical (p.ex., *Opisthoaulax* spp., Figura 4.2e). No género *Ceratium* as células têm prolongamentos tanto no epicone como no hipocone (Figura 4.2b).

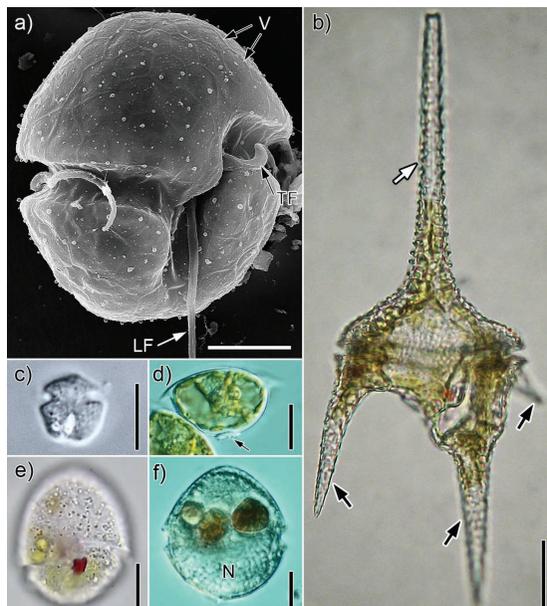


Figura 4.2. Variedade de morfologias em dinoflagelados de água doce (a, microscopia eletrónica de varrimento; b–f, microscopia óptica): a) *Borghiella andersenii*, vista ventral. Flagelo transversal (TF) no cingulo e flagelo longitudinal (LF) no sulco. Superfície da célula com numerosas vesículas do anfiema (V). Escala = 5 μm ; b) *Ceratium hirundinella*, vista ventral. Morfotipo com uma apófise longa no epicone (seta branca) e três apófises de tamanhos diferentes no hipocone (setas pretas). Espécie fotossintética; teca com estrutura reticulada forte. Escala = 20 μm ; c) Vista ventral de *Prosoaulax lacustris*, espécie heterotrófica com o epicone menor que o hipocone. Escala = 10 μm ; d) *Dinococcus oedogonii*, secção óptica de uma forma cocóide. A célula foi destacada do seu substrato, mostrando o disco de fixação (seta). Escala = 10 μm ; e) *Opisthoaulax vorticella*, vista ventral; espécie heterotrófica com vacúolos digestivos predominantemente no hipocone que, nesta espécie, é menor que o epicone. Escala = 10 μm ; f) *Tyrannodinium edax*, secção óptica; espécie heterotrófica com vacúolos digestivos no epicone e núcleo (N) grande ocupando quase todo o hipocone. Escala = 10 μm . Fotografias: António José Calado e Sandra Carla Craveiro.

3.2.2. Ecologia

Os dinoflagelados de água doce podem ser encontrados em todos os tipos de formações aquáticas (lagos, rios, albufeiras, charcos, etc.) e em todas as regiões do mundo, desde zonas polares a temperadas e tropicais. As características físico-químicas dos diferentes meios aquáticos variam em termos de temperatura, pH, condutividade, nutrientes, etc., condicionando a distribuição e biogeografia das diferentes espécies de dinoflagelados. A variação sazonal das espécies está também dependente em grande medida da variação destes fatores. As espécies fotossintéticas (p.ex., *Chimonodinium lomnickii*) têm geralmente picos sazonais que se repetem anualmente, enquanto as heterotróficas podem ocorrer ao longo de todo o ano com picos mais irregulares (p.ex., *Gyrodinium helveticum*)^{18,19}.

3.2.3. Estudos desenvolvidos

Os primeiros registos de dinoflagelados em águas doces portuguesas são de Lacerda²⁰ e Frade^{21,22}. Seguiram-se os trabalhos de Nauwerck^{23,24} que registou 24 espécies de dinoflagelados ao estudar amostras de meios aquáticos (incluindo 13 albufeiras) de todo o país. Durante as décadas de 1960, 1970 e 1980, vários trabalhos gerais sobre biodiversidade de microalgas de água doce fizeram aumentar o número de dinoflagelados conhecidos em Portugal (p.ex., ²⁵⁻²⁹). A lista geral de taxa referenciados para águas interiores de Portugal continental foi reunida em Pandeirada et al.³⁰. A lista inclui a reavaliação da posição taxonómica de muitas espécies e adiciona uma dúzia de novos registos de taxa. Esta lista deverá ser complementada com a consulta de Craveiro et al.³¹⁻³³, Pandeirada et al.^{34,35} e Daugbjerg et al.³⁶. O número total de espécies referenciadas para águas continentais portuguesas é presentemente 52, distribuídas por 28 géneros.

Ao longo dos últimos vinte anos, várias contribuições sobre mecanismos de alimentação, estrutura fina e filogenia de dinoflagelados foram baseados no estudo de exemplares colhidos em águas interiores portuguesas (p.ex., ^{37,38}).

3.3. Diatomáceas

3.3.1. Citologia e diversidade morfológica

As diatomáceas são organismos eucarióticos maioritariamente fotossintéticos, de cor dourada-acastanhada. Estes organismos não flagelados podem ocorrer no seu estado unicelular ou colonial. A característica mais distintiva relativamente aos outros grupos de algas é a sua parede celular bivalve de natureza siliciosa ricamente ornamentada (Figura 4.3). A frústula (parede celular) é constituída por duas partes ou valvas que podem encaixar diretamente uma na outra sendo a epivalva ligeiramente maior do que a hipovalva que encaixa por dentro da primeira. O mais usual, no entanto, é a existência de um número variável de faixas ou bandas conetivas a ligarem as duas valvas (Figura 4.3a).

A identificação das diatomáceas baseia-se essencialmente na estrutura da frústula, tornando-se necessário remover o conteúdo celular (Figura 4.3b-j). De uma forma simplificada pode-se dizer que morfológicamente as diatomáceas podem ser cêntricas se apresentarem ornamentação com simetria radiada (Figura 4.3b) ou pinuladas se tiverem simetria bilateral (restantes imagens da Figura 4.3). Este último grupo domina em águas correntes pois inclui a maioria das diatomáceas perifíticas e/ou móveis quando em contacto com um substrato. Em vista valvar as diatomáceas pinuladas podem apresentar simetria considerando os planos apical e transapical (Figura

4.3c, e, g, h, i) ou assimetria em relação ao plano apical (Figura 4.3j) ou transapical (Figura 4.3d, f). As diatomáceas pinuladas que possuem rafe (fenda longitudinal na superfície valvar) podem mover-se quando em contacto com um substrato (Figura 4.3a, e-j).

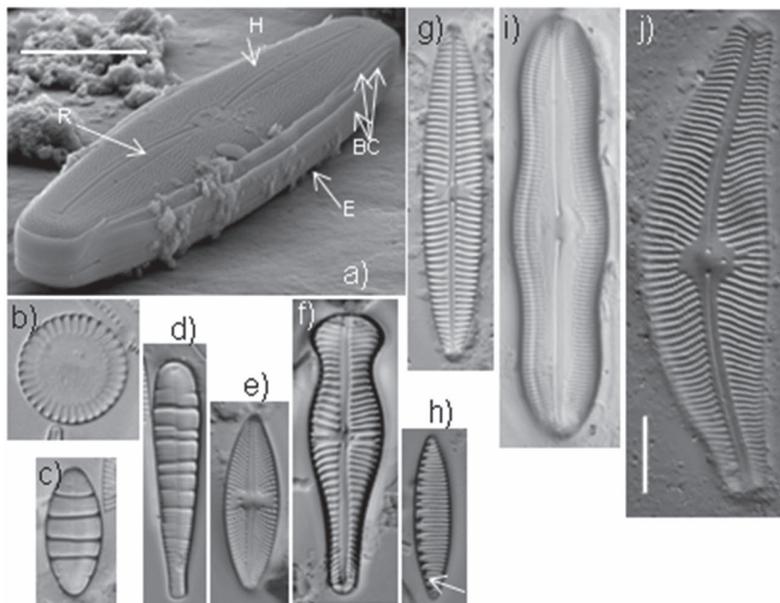


Figura 4.3. Diversidade morfológica de diatomáceas de água doce (a, microscopia eletrónica de varrimento, escala = 10 μm ; b-j, microscopia óptica em vista valvar, escala = 10 μm): a) *Frustulia vulgaris* em vista valvar com vista conetiva parcialmente visível: epivalva (E), hipovalva (H), três bandas conetivas visíveis (BC), rafe tipo fenda (R); b) *Cyclotella meneghiniana*; c) *Diatoma mesodon*; d) *Meridion circulare*; e) *Luticola goeppertiana*; f) *Gomphonema truncatum*; g) *Navicula tripunctata*; h) *Nitzschia amphibia*, rafe tipo canal rafeano (seta); i) *Caloneis silicula*; j) *Cymbella tumida*. Fotografias: Salomé F.P. Almeida e Carmen L. Elias.

3.3.2. Estudos desenvolvidos

As primeiras referências a diatomáceas de Portugal continental remontam ao século XIX, com os trabalhos de Ehrenberg³⁹, Colmeiro

(p.ex., ⁴⁰) e Del-Amo y Mora⁴¹, que citam diatomáceas colhidas no rio Tejo, em Coimbra e no Porto. Destacam-se ainda trabalhos de Henriques (p.ex., ⁴²) e de De-Toni⁴³. No início do século XX são publicados os primeiros catálogos e descrições de diatomáceas (p.ex., ^{23,24,44-46}).

No final do século XX e início do século XXI observou-se uma evolução, quer em número, quer na natureza das publicações, inicialmente de carácter florístico, com caracterização morfológica dos taxa observados e informação do local de colheita, para estudos detalhados sobre a sua ecologia (p.ex., ^{47,48}), morfologia, taxonomia e ultraestrutura (p.ex., ⁴⁹⁻⁵³), utilização como bioindicadores (p.ex., ⁵⁴⁻⁵⁷) e adaptação a ambientes extremos (p.ex., ⁵⁸). A implementação da Diretiva Quadro da Água (DQA)⁵⁹ veio promover o estudo sistematizado das diatomáceas, incluindo a sua colheita e identificação em cursos de água de todo o país⁶⁰, que eram até então geograficamente limitados.

3.3.3. Papel como indicadores

Um indicador biológico (espécie ou comunidade) é aquele que pela sua presença pode fornecer informação acerca das condições químicas e/ou físicas do ambiente que o rodeia¹. Os primeiros estudos sobre o efeito da poluição nas comunidades de diatomáceas surgiram na década de 1940 (p.ex., ⁶¹) seguidos de muitos outros comprovando o potencial e robustez da utilização destes organismos para avaliação da qualidade de águas lóxicas⁶². Em Portugal, a sua utilização para este fim começou a ser notória a partir da década de 1980 (p.ex., ⁴⁸). Às diatomáceas são reconhecidas vantagens como indicadores da qualidade da água, como o facto de (i) ser o grupo de algas mais diversificado, mais ubíquo e muitas vezes o mais abundante em meios lóxicos¹, (ii) de em conjunto reagirem a um amplo gradiente ambiental químico (matéria orgânica, inorgânica, pH, condutividade) e físico (morfologia do canal e margens, conectividade, sedimentos)

(p.ex., ⁶³), (iii) de serem fáceis de amostrar e preservar, e (iv) de existir uma extensa bibliografia sobre a sua autoecologia e identificação. As diatomáceas são atualmente um dos elementos de qualidade biológica (EQB) obrigatórios na avaliação do estado ecológico dos rios europeus de acordo com a DQA⁵⁹.

Em Portugal, foram construídos modelos preditivos baseados em diatomáceas para determinação do estado ecológico dos ribeiros, primeiro para a região centro⁶⁴ e depois para todo o território continental⁶³. Estes modelos baseiam-se no conceito de condição de referência (estado no presente ou no passado que corresponde à ausência de pressões antropogénicas significativas ocorrendo apenas pequenas alterações físico-químicas, hidromorfológicas e biológicas)⁶⁵ constituindo ferramentas mais adequadas à determinação do estado ecológico de águas correntes de acordo com as exigências da DQA. Foi ainda proposto um procedimento baseado na combinação de dois métodos – modelação e filtros ambientais (variáveis ambientais, p.ex., abióticas, interações biológicas, atributos das espécies) expressas hierarquicamente a múltiplas escalas ao nível da paisagem (desde o microhabitat à escala de bacia hidrográfica), que determinam a composição e a estrutura das comunidades biológicas locais ⁶⁶ para definição da condição de referência.

Uma abordagem relativamente recente mostrou ser possível definir a ecologia de diatomáceas a partir de outras próximas filogeneticamente, dado que existe uma relação entre a filogenia e ecologia (i.e., espécies próximas filogeneticamente mostram preferências ecológicas semelhantes^{67,68}).

3.3.4. Diatomáceas de ambientes extremos: zonas mineiras

A Faixa Piritosa Ibérica (FPI) estende-se desde a região do Alentejo (Portugal) à região da Andaluzia (Espanha), contendo mais de 90

depósitos de sulfuretos maciços (principalmente pirite, Fe_2S), onde a exploração mineira conta com mais de 2000 anos de existência até ao presente (p.ex., minas de Neves Corvo e Aljustrel). Devido à instabilidade química e geotécnica provocada pela exploração dos minérios, os seus resíduos sofrem oxidação, originando drenagem ácida de mina. Outras minas (p.ex., Coval da Mó, Palhal) presentemente desativadas, situadas na região de Aveiro (no centro-norte de Portugal) e mais especificamente nas bacias dos rios Caima e Mau, afluentes do rio Vouga, foram importantes na exploração de metais como o chumbo, o cobre e a prata.

Nas bacias hidrográficas afetadas pela atividade mineira os cursos de água e os solos encontram-se contaminados com vários metais tornando-se inóspitos para a vida aquática que neles se encontra. Estas massas de água foram, durante muito tempo, consideradas como ambientes extremos e desprovidos de vida, e por isso, candidatos a medidas de reabilitação. Contudo, a descoberta de organismos extremófilos, maioritariamente bactérias, embora existam também eucariotas tais como fungos, algas verdes e diatomáceas (p.ex., *Pinnularia acoricola*⁶⁹ e *Pinnularia aljustrellica*⁷⁰), mostrou que existem organismos capazes de sobreviver nestas condições inóspitas.

As diatomáceas são indicadoras por excelência destes ambientes extremos tanto ao nível da comunidade, com a substituição de espécies sensíveis por outras tolerantes (como é o caso das espécies de *Pinnularia* atrás referidas), como ao nível do indivíduo, com alterações morfológicas a nível da frústula, por exemplo em *Achnanthisidium minutissimum*, *Brachysira vitrea*, *Eunotia exigua* e diversas espécies de *Fragilaria* (p.ex.,^{71,72}).

Não sendo os atuais índices biológicos capazes de caracterizar estes ambientes por terem sido desenvolvidos para avaliarem sobretudo a contaminação orgânica e por nutrientes, torna-se necessário conceber um novo índice mais completo que deverá incluir, na sua composição, parâmetros físico-químicos de águas e sedimentos, tais

como metais e pH, e também outros parâmetros biológicos (fisiológicos, bioquímicos, moleculares).

4. Outras leituras

- Novais M.H., Blanco S., Morais M.M., Hoffmann L. & L. Ector 2015. Catalogue of continental diatoms from Portugal, including the Archipelagos of Azores and Madeira. Updated nomenclature, distribution and bibliography. In: Witkowski, A. (ed.) *Diatom monographs*. 17A-C. Koeltz Scientific Books. Germany, Königstein
- Santos L. M. A. & Santos M.F. 2004. The Coimbra Culture Collection of Algae (ACOI). *Nova Hedwigia* 79: 39–47
- Santos L.M.A. Santos M. F., Gil M. C. & Pereira M. J. 2002. Diversity of freshwater algae. In: Pardal M., J.C. Marques J.C. & M.A.S. Graça M.A.S. (eds.) *Aquatic ecology of the Mondego River basin. Global importance of local experience*. Imprensa da Universidade de Coimbra. Portugal, Coimbra

5. Referências bibliográficas

- ¹Bellinger E.G. & Sigeo D.C. 2010. *Freshwater algae. Identification and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Ltd. UK, Chichester, West Sussex
- ²van den Hoek C., Mann, D.G. & Jahns, H.M. 1995. *Algae. An introduction to phycology*. Cambridge University Press. UK, Cambridge
- ³Round F.E. 1981. *The ecology of algae*. Cambridge University Press. UK, Cambridge
- ⁴Graham L.E. & Wilcox L.W. 2000. *Algae*. Prentice-Hall, Inc. USA, Upper Saddle River
- ⁵Hilton J., O'Hare M., Bowes M.J. & Jones J.I. 2006. How green is my river? A new paradigm of eutrophication in rivers. *Sci. Total Environ.* 365: 66–83
- ⁶Stevenson J. 2014. Ecological assessments with algae: a review and synthesis. *J. Phycol.* 50: 437–461
- ⁷Sampaio J. 1933. Apontamentos para o estudo das cianófitas portuguesas. *Anais da Faculdade de Ciências Porto XVIII*: 49–59
- ⁸Vasconcelos V.M. 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters. *Arch. Hydrobiol.* 130: 439–45
- ⁹Vasconcelos V.M., Sivonen K., Evans W.R., Carmichael W.W. & Namikoshi M. 1996. Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. *Water Res.* 30: 2377–2384
- ¹⁰Vasconcelos V. 2006. Eutrophication, toxic cyanobacteria and cyanotoxins: when ecosystems cry for help. *Limnetica* 25: 452–432

- ¹¹Lopes V.R., Schmidtke M., Fernandes M.H., Martins R. & Vasconcelos V. 2011. Cytotoxicity in L929 fibroblasts and inhibition of herpes simplex virus type 1 Kupka viruses by estuarine cyanobacteria. *Toxicol. in vitro* 25: 944–950
- ¹²Leão P.N., Costa M., Ramos V., Pereira A.R., Fernandes V.C., Domingues V.F., Gerwick W.H., Vasconcelos V. & Martins R. 2013. Antitumor activity of hierridin B, a cyanobacterial secondary metabolite found in both filamentous and unicellular marine strains. *PLoS One* 8/9: e69562
- ¹³Castro M., Preto M., Vasconcelos V. & Urbatzka R. 2016. Obesity: the metabolic disease, advances on drug discovery and natural product research. *Curr. Top. Med. Chem.* 16: 1–28
- ¹⁴Leão P.N., Vasconcelos M.T.S.D. & Vasconcelos V. 2009. Allelopathic activity of low cell densities of Cyanobacteria on microalgae. *Eur. J. Phycol.* 44: 347–355
- ¹⁵Almeida J., Freitas M., Cruz S., Vasconcelos V. & Cunha I. 2015. Acetylcholinesterase in biofouling species: characterization and mode of action of cyanobacteria-derived antifouling agents. *Toxins* 7: 2739–2756
- ¹⁶Ramos V., Morais J., Vasconcelos V. 2017. CYANOTYPE v1.0: a manually curated dataset of categorized cyanobacterial strains relevant for modern taxonomy, phylogenetic and phylogenomic studies. *Sci. Data* 4: 17005
- ¹⁷Kofoed C.A. 1909. On *Peridinium steinii* Jörgensen, with a note on the nomenclature of the skeleton of the Peridinidae. *Arch. Protistenk.* 16: 25–47
- ¹⁸Nauwerck A. 1963. Die Beziehungen zwischen Zooplankton und Phytoplankton im See Erken. *Symb. Bot. Upsal.* 17: 1–163
- ¹⁹Wille E. & Hoffmann L. 1991. Population dynamics of the dinoflagellate *Gymnodinium belveticum* Penard in the Reservoir of Esch-sur-Sûre (G.-D. of Luxembourg). *Belg. J. Bot.* 124: 109–114
- ²⁰Lacerda F.S. 1948. Notas algológicas. *Bol. Soc. Portug. Ci. Nat.* 16: 94–106
- ²¹Frade F. 1954. Albufeira de Castelo do Bode. A água e alguns dos seus microorganismos. *Bol. Com. Fisc. Águas* 35: 129–137
- ²²Frade F. 1957. Prospecções hidrobiológicas. Albufeira de Castelo do Bode. *Bol. Com. Fisc. Águas* 38: 5–10
- ²³Nauwerck A. 1959. Beitrag zur Kenntnis des Phytoplanktons portugiesischer Gewässer. *Bol. Soc. Brot., Sér. 2*, 33: 223–231
- ²⁴Nauwerck A. 1962. Zur Systematik und Ökologie Portugiesischer Planktonalgen. *Mem. Soc. Brot.* 15: 5–55
- ²⁵Rodrigues J.E.M. 1961. Contribuição para o conhecimento das algas de água doce de Portugal. *Bol. Soc. Brot., Sér. 2*, 35: 185–212
- ²⁶Rino J.A. 1967. Subsídios para o conhecimento das algas de Portugal – II. *Portugaliae Acta Biol., Sér. B, Sist.* 9: 106–145
- ²⁷Rino J.A. 1969. Subsídios para o conhecimento das algas de Portugal – IV. *Anuário Soc. Brot.* 35: 41–91
- ²⁸Santos M.F. 1976. Contribuições para o conhecimento das algas de água doce de Portugal – V. *Bol. Soc. Brot., Sér. 2*, 50: 169–230
- ²⁹Oliveira M.R.L. 1982. Composição específica, densidade e dinâmica sazonal do fitoplâncton das albufeiras de Bouçã, Cabril, Santa Luzia e Pracana. *Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas* 8: 5–25

- ³⁰Pandeirada M.S., Craveiro S.C. & Calado A.J. 2013. Freshwater dinoflagellates in Portugal (W Iberia): a critical checklist and new observations. *Nova Hedwigia* 97: 321–348
- ³¹Craveiro S.C., Pandeirada M.S., Daugbjerg N., Moestrup Ø. & Calado A.J. 2013. Ultrastructure and phylogeny of *Theleodinium calcisporum* gen. et sp. nov., a freshwater dinoflagellate that produces calcareous cysts. *Phycologia* 52: 488–507
- ³²Craveiro S.C., Daugbjerg N., Moestrup Ø. & Calado A.J. 2015. Fine-structural characterization and phylogeny of *Peridinium polonicum*, type species of the recently described genus *Naiadinium* (Dinophyceae). *Eur. J. Protistol.* 51: 259–279
- ³³Craveiro S.C., Daugbjerg N., Moestrup Ø. & Calado A.J. 2016 ("2017"). Studies on *Peridinium aciculiferum* and *Peridinium malmogiense* (= *Scrippsiella hangoei*): comparison with *Chimonodinium lomnickii* and description of *Apocalathium* gen. nov. (Dinophyceae). *Phycologia* 56: 21–35
- ³⁴Pandeirada M.S., Craveiro S.C., Daugbjerg N., Moestrup Ø. & Calado A.J. 2014. Studies on woloszynskioid dinoflagellates VI: description of *Tovellia aveirensis* sp. nov. (Dinophyceae), a new species of Tovelliaceae with spiny cysts. *Eur. J. Phycol.* 49: 230–243
- ³⁵Pandeirada M.S., Craveiro S.C., Daugbjerg N., Moestrup Ø. & Calado A.J. 2017. Studies on woloszynskioid dinoflagellates VIII: life cycle, resting cyst morphology and phylogeny of *Tovellia rinoi* sp. nov. (Dinophyceae). *Phycologia* 56: 533–548
- ³⁶Daugbjerg N., Andreasen T., Happel E., Pandeirada M.S., Hansen G., Craveiro S.C., Calado A.J. & Moestrup Ø. 2014. Studies on woloszynskioid dinoflagellates VII: description of *Borgbiella andersenii* sp. nov.: light and electron microscopy and phylogeny based on LSU rDNA. *Eur. J. Phycol.* 49: 436–449
- ³⁷Calado A.J. & Moestrup Ø. 1997. Feeding in *Peridiniopsis berlinensis* (Dinophyceae): new observations on tube feeding by an omnivorous, heterotrophic dinoflagellate. *Phycologia* 36: 47–59
- ³⁸Craveiro S.C., Calado A.J., Daugbjerg N., Hansen G. & Moestrup Ø. 2011. Ultrastructure and LSU rDNA-based phylogeny of *Peridinium lomnickii* and description of *Chimonodinium* gen. nov. (Dinophyceae). *Protist* 162: 590–615
- ³⁹Ehrenberg C.G. 1845. Novorum Generum et Specierum brevis definitio. Zusätze zu seinen letzten Mittheilung über die mikroskopischen Lebensformen von Portugal und Spanien, Süd-Afrika, Hinter-Indien, Japan und Kurdistan, und lege die folgenden Diagnosen u. s. w. Bericht über die zur Bekanntmachung geeigneten. *Verb. Konig. Preuss. Akad. Wiss. Berlin.* 1845: 357–377
- ⁴⁰Colmeiro M. 1867. Enumeración de las criptógamas de España y Portugal. Parte segunda. Talogenas: hongos, líquenes, collemaceas, algas. *Revista Progr. Ci. Exact.* 17, 18
- ⁴¹Del-Amo y Mora M. 1870. *Flora cryptogámica de la Península Ibérica, que contiene la descripción de las plantas acotyledóneas que crecen en España y Portugal, distribuidas segun el método de familias.* Imprenta de D. Indalecio Ventura. Espanha, Granada
- ⁴²Henriques J.A. 1884. A vegetação da Serra do Gerês. *Bol. Soc. Brot.* 3: 155–225
- ⁴³De Toni G.B. 1888. Manipulo d'algas portuguesas. Colhidas pelo sr. A. F. Moller. *Bol. Soc. Brot.* 6: 187–192

- ⁴⁴Carvalho F.L. 1913. Diatomáceas da Guarda. Materiais para o estudo das diatomáceas portuguesas. *Separata da revista da Universidade de Coimbra* 1: 1–117
- ⁴⁵Zimmermann C. 1915. Algumas diatomáceas novas ou curiosas. *Broteria, Ser. Bot.* 13: 33–36
- (46) Silva A.A. 1946. Diatomáceas novas para Portugal. *Anales Jard. Bot. Madrid* 6: 213–218
- (47) Caldas F.B. 1988. Caracterização biológica da qualidade da água do rio Tejo por meio das comunidades bentónicas de diatomáceas. In: Borrego C., Fernandes I., Rosa Pires A. & Samagaio A. (eds.) *1ª Conferência Nacional sobre a qualidade do ambiente*. Universidade de Aveiro. Portugal, Aveiro
- ⁴⁸Gil M.C.P., Rino J.A. & Nicolau F.C. 1989–90. Estudo ecológico das diatomáceas dos rios Águeda, Agadão e Alfusqueiro. Flora primavera. *Rev. Biol. U. Aveiro.* 3: 97–137
- ⁴⁹Almeida S.F.P., Craveiro S.C. & Calado A.J. 2010. On the identity and distribution in Northern Portugal of three *Gomphonema* species currently misidentified as *Gomphonema clevei*. *Diatom Res.* 25: 13–27
- ⁵⁰Delgado C., Novais M.H., S. Blanco & Almeida S.F.P. 2015. Examination and comparison of *Fragilaria candidagilae* sp. nov. with type material of *Fragilaria recapitellata*, *F. capucina*, *F. perminuta*, *F. intermedia* and *F. neointermedia* (Fragilariales, Bacillariophyceae). *Phytotaxa* 231: 1–18
- ⁵¹Novais M.H., Blanco S., Hlúbíková D., Falasco E., Gomá J., Delgado C., Ivanov P., Ács E., Morais M., Hoffmann L. & Ector L. 2009. Morphological examination and biogeography of the *Gomphonema rosenstockianum* and *G. tergestinum* species complex (Bacillariophyceae). *Fottea* 9: 257–274
- (52) Novais M.H. 2011. *Diatomáceas bênticas em sistemas lóticos de Portugal continental*. Tese de doutoramento. Universidade de Évora. Portugal, Évora
- ⁵³Novais M.H., Wetzel C.E., Van de Vijver B., Morais M., Hoffmann L. & Ector L. 2013. New species and combinations in the genus *Geissleria* (Bacillariophyceae). *Cryptogam. Algal.* 34: 117–148
- ⁵⁴Carqueira da Silva M.M. & Cunha M.J. 1992. Avaliação da qualidade da água em meios lóticos através da caracterização das comunidades algais. In: Pires R.A., Pio C., Boia C & Nogueira T. (eds) *III Conferência Nacional sobre a qualidade do ambiente* vol I: 198–206
- ⁵⁵Almeida S.F.P. & Gil M.C.P. 2001. Ecology of freshwater diatoms from the central region of Portugal. *Cryptogam. Algal.* 22: 109–126
- ⁵⁶Feio M.J., Almeida S.F.P., Craveiro S.C. & Calado A.J. 2009. A comparison between biotic indices and predictive models in stream water quality assessment based on benthic diatom communities. *Ecol. Indic.* 9: 497–507
- ⁵⁷Elias C.L., Calapez A.R., Almeida S.F.P. & Feio M.J. 2015. Determining useful benchmarks for the bioassessment of highly disturbed lowland areas based on diatoms: Balancing the concept of reference condition and natural variability. *Limnologica* 51: 83–93
- ⁵⁸Luís A.T., Coelho H., Almeida S.F.P., Ferreira da Silva E. & Serôdio J. 2013. Photosynthetic activity and ecology of benthic diatom communities from streams affected by Acid Mine Drainage (AMD) in pyritic mines. *Fund. Appl. Limnol.* 182: 47–59

- ⁵⁹ Comissão Europeia. 2000. Directiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000, que estabelece um Quadro de Acção Comunitária no Domínio da Política da Água. *J. Oficial Com. Europeias* L327: 1–72
- ⁶⁰ Morais M., Novais M.H., Nunes S., Pedro A., Almeida S.F.P., Craveiro S., Rodrigues A.M.F., Castro L. & Barreto Caldas F. 2009. Validação da tipologia de rios por diatomáceas bentónicas – Implementação da Directiva Quadro da Água em Portugal Continental. *Recursos Hídricos* 30: 21–28
- ⁶¹ Butcher R.W. 1947. Studies in the ecology of rivers. IV. The algae of organically enriched water. *Journal of Ecology* 35: 186–191
- ⁶² Rimet F. 2012. Recent views on river pollution and diatoms. *Hydrobiologia* 683: 1–24
- ⁶³ Almeida S.F.P. & Feio M.J. 2012. DIATMOD: Diatom predictive model for quality assessment of Portuguese running waters. *Hydrobiologia* 695: 185–197
- ⁶⁴ Feio M.J., Almeida S.F.P., Craveiro S.C. & Calado A.J. 2007. Diatoms and macroinvertebrates provide consistent and complementary information on environmental quality: a predictive model approach. *Fund. Appl. Limnol./Arch. Hydrobiol.* 1689: 247–258
- ⁶⁵ Reynoldson T.B., Norris R.H., Resh V.H., Day K.E. & Rosenberg D.M. 1997. The reference condition: a comparison of multimetric and multivariate approaches to assess water-quality impairment using benthic macroinvertebrates. *J. North. Am. Benthol. Soc.* 16: 833–852
- ⁶⁶ Elias C.L., Calapez A.R., Almeida S.F.P., Chessman B., Simões N. & Feio M.J. 2016. Predicting reference conditions for river bioassessment by incorporating boosted trees in the environmental filters method. *Ecol. Indic.* 69: 239–251
- ⁶⁷ Keck F., Bouchez A., Franc A. & Rimet F. 2016. Linking phylogenetic similarity and pollution sensitivity to develop ecological assessment methods: A test with river diatoms. *J. Appl. Ecol.* 53: 856–864
- ⁶⁸ Esteves S.M., Keck F, Almeida S.F.P., Figueira E., Bouchez A. & Rimet F. 2017. Can we predict diatoms herbicide sensitivities with phylogeny? Influence of intraspecific and interspecific variability. *Ecotoxicology* 26: 1065–1077
- ⁶⁹ Luís A.T., Teixeira P., Almeida S.F.P., Matos J.X., Ferreira da Silva E. 2011. Environmental impact of mining activities in the Lousal area (Portugal): chemical and diatom characterization of metal-contaminated stream sediments and surface water of Corona stream. *Sci. Total Environ.* 409: 4312–4325
- ⁷⁰ Luís A.T., Novais M.H., Van de Vijver B., Almeida S.F.P., Ferreira da Silva E.A., Hoffmann L. & Ector L. 2012. *Pinnularia aljustrellica* sp. nov. (Bacillariophyceae), a new diatom species found in acidic waters in the Aljustrel mining area (Portugal), and further observations on the taxonomy, morphology and ecology of *P. acidophila* Hofmann et Krammer and *P. acoricola* Hustedt. *Fottea* 12: 27–40
- ⁷¹ Ferreira da Silva E., Almeida S.F.P., Nunes M.L., Luís A.T., Borg F., Hedlund M., Marques de Sá C., Patinha C. & Teixeira P. 2009. Heavy metal pollution downstream the abandoned Coval da Mó mine (Portugal) and associated effects on epilithic diatom communities. *Sci. Total Environ.* 407: 5620–5636
- ⁷² Luís A.T., Durães N., Almeida S.F.P. & Ferreira da Silva, E. 2016. Integrating geochemical (surface waters, stream sediments) and biological (diatoms) approaches to assess AMD environmental impact in a pyritic mining area: Aljustrel (Alentejo, Portugal). *J. Environ. Sci.* 42: 215–226