



**Sónia Catarina Reis
Vieira**

**Estudo *in situ* da actividade fotossintética do
microfitobentos**



**Sónia Catarina Reis
Vieira**

**Estudo *in situ* da actividade fotossintética do
microfitobentos**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências das Zonas Costeiras, realizada sob a orientação científica do Dr. João António de Almeida Serôdio, Professor Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Doutora **Filomena Maria Cardoso Pedrosa Ferreira Martins**, Professora Associada da Universidade de Aveiro

Doutor **Jorge Miguel Luz Marques da Silva**, Professor Auxiliar da Faculdade de Ciências de Lisboa

Doutor **João António de Almeida Serôdio**, Professor Auxiliar da Universidade de Aveiro (**Orientador**)

agradecimentos

Aos meus Pais e família, um grande obrigado, por todo o apoio e incentivo durante a realização deste trabalho. Sem a vossa ajuda teria sido mesmo impossível.

Às minhas amigas, Sónia Cruz e Helena Coelho por toda a ajuda, na execução do trabalho de campo e laboratorial (madrugadas, noitadas e fins de semana). Sem a vossa ajuda não teria sido possível nem tão agradável a sua realização. Muito obrigada pelas conversas, risadas, discussões e opiniões que durante os dias Longos de trabalho no campo me proporcionaram. Agradeço também toda a paciência, disponibilidade, crítica e força de vontade que me transmitiram para este trabalho. Obrigada Meninas!

Aos meus amigos, em especial o Ricardo, que apesar de não terem tido um papel activo na realização deste trabalho me aturaram e ouviram e ouviram ...tantas vezes.

Às minhas colegas de Mestrado (Susana Oliveira, Helena Coelho, Marta Cerejo, Ana Sofia) por toda ajuda e apoio na parte curricular e pelas boas quintas, sextas e sábados que passámos juntas...

Ao Professor João Serôdio, orientador científico, um muito obrigado pela apoio e confiança que me proporcionou e sobretudo por toda a motivação que me criou ao longo de todo o trabalho realizado.

Muito obrigada a todos!

palavras-chave

Microfitobentos; Fluorometria PAM; Fotoprotecção; Medições *in situ*

resumo

O presente estudo teve por objectivos o estudo *in situ* da actividade fotossintética e a caracterização do estado de fotoaclimação do microfitobentos estuarino, utilizando fluorometria de pulso modulado (PAM). Foram realizadas duas campanhas de amostragem ao longo de dois ciclos semi-lunares de maré (Julho e Novembro de 2004), no Canal de Ílhavo da Ria de Aveiro. Durante os períodos de baixa-mar diurnos foram medidos parâmetros de fluorescência: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$), a fluorescência mínima (F_o), e a eficiência máxima do fotossistema II (F_v/F_m), e parâmetros físicos: a salinidade (S), a temperatura (T), e a irradiância (E), em amostras intactas de sedimento. O estado de fotoaclimação das comunidades de microfitobentos foi caracterizado pela medição da resposta à luz da taxa de transporte de electrões (ETR) e do amortecimento não-fotoquímico (NPQ, indicador da capacidade de fotoprotecção), pela construção curvas de ETR vs. E e NPQ vs. E, em suspensões de microalgas. Todos os parâmetros medidos *in situ* apresentaram uma elevada variabilidade horária, caracterizada por decréscimos muito acentuados nos valores de $\Delta F/F_m$ e F_v/F_m , sob irradiâncias superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Em condições laboratoriais constantes, verificou-se também uma elevada variabilidade horária nos parâmetros obtidos a partir das curvas de luz. Em Julho, foram observados os valores mais elevados da taxa máxima de transporte de electrões (ETR_m) e do parâmetro de saturação luminosa (E_k), e valores mais baixos de NPQ no escuro (NPQ(0)) e de NPQ máximo (NPQ(1700)). Os resultados sugerem que em condições naturais o historial luminoso recente tem um papel crucial na resposta fotossintética às variações de intensidade luminosa pelo microfitobentos estuarino. Por outro lado, indicam uma variação sazonal no estado de fotoaclimação das microalgas e na capacidade de desenvolvimento de mecanismos de fotoprotecção. A variação sazonal na resposta à luz foi acompanhada por uma substancial mudança na composição taxonómica das amostras de microfitobentos, o que foi interpretado como resultado de alterações na resposta fotoprotectora associada à aclimação a condições de Inverno.

keywords

Microphytobenthos; PAM fluorometry; photoprotection; *in situ* measurements

abstract

The aim of this study was the *in situ* study of the photosynthetic activity and the characterisation of the photoacclimation response of estuarine microphytobenthos, using pulse amplitude modulated fluorometry (PAM). Sampling was carried out in two spring-neap tidal cycles (July and November, 2004) in the Canal de Ílhavo, Ria de Aveiro, Portugal. During low tide, fluorescence parameters: the effective quantum yield of the PSII ($\Delta F/F_m'$), the minimum fluorescence (F_o) and the maximum quantum yield of PSII (F_v/F_m), and physical parameters: salinity (S), temperature (T), and irradiance (E), were measured in intact microphytobenthos assemblages. The photoacclimation status of the microphytobenthos assemblages was characterised by measuring the light response of the electron transport rate (ETR) and the non-photochemical quenching (NPQ, photoprotective capacity) by constructing ETR vs. E and NPQ vs. E curves, in suspensions of microalgae. A high hourly variability was found for all parameters measured *in situ*, characterised by significant decreases in $\Delta F/F_m'$ and F_v/F_m values under irradiances above $500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Also in laboratory constant conditions it was found a large hourly variability in all light curve parameters. Higher values of maximum rate of electron transport (ETR_m) and saturation parameter (E_k), and lower values of NPQ in the dark (NPQ(0)) and maximum NPQ (NPQ(1700)) were found in the summer sampling period. These results suggest that recent light history of microphytobenthos, in natural conditions, plays a role in the photosynthetic response to variation in ambient irradiance. On the other hand, a seasonal change was observed regarding the photoacclimation status of the microalgae and the development of photoprotective mechanisms. This seasonal variation in the light response was found to be associated to substantial changes in the taxonomic composition of microphytobenthos assemblages, and was interpreted as a resulting from changes in the potential photoprotective associated to thermal acclimation to winter conditions.

ÍNDICE

Índice de Figuras e Tabelas	13
Símbolos e abreviaturas	15
1. Introdução	
1.1 O microfitobentos estuarino	18
1.2 Fluorometria de pulso modulado	20
1.3 Objectivos	23
2. Material e métodos	
2.1 Local de estudo	26
2.2 Estratégia de amostragem	26
2.3 Medições <i>in situ</i>	
2.3.1 Sistema de medição	28
2.3.2 Medições de fluorescência	28
2.3.3 Medições de parâmetros físicos	29
2.4 Experiências laboratoriais	
2.4.1 Colheita das amostras	30
2.4.2 Medições de fluorescência	30
2.5 Composição taxonómica	32
2.6 Tratamento estatístico	32
3. Resultados	
3.1 Variabilidade horária <i>in situ</i>	34
3.2 Resposta à luz de $\Delta F/F_m'$	42
3.3 Resposta à luz de $\Delta F/F_m'$: sedimento vs. suspensões	43
3.4 Variabilidade sazonal e estudo de fotoaclimação	44

3.5 Composição taxonómica	48
4. Discussão	
4.1 Variabilidade horária <i>in situ</i>	52
4.2 Resposta à luz de $\Delta F/F_m'$: efeito de histerese	56
4.3 Variabilidade sazonal e estudo de fotoaclimação	57
4.4 Implicações do estudo	60
4.5 Conclusões	61
5. Referências bibliográficas	63

ÍNDICE de FIGURAS e TABELAS

- Figura 1.** Diagrama esquemático dos mecanismos que regulam a actividade do PSII. O fluxo de fotões induzido pela energia de luz absorvida leva à competição de diferentes mecanismos: o amortecimento fotoquímico, a dissipação térmica e a emissão de fluorescência. 21
- Figura 2.** Localização e mapa da Ria de Aveiro com indicação do local de amostragem (A e B). Aspecto do local de estudo em preia-mar (C) e em baixa-mar (D). 27
- Figura 3.** Sistema de medição de parâmetros de fluorescência *in situ* com as diferentes réplicas (A). Colheita das amostras (B). Fluorómetro PAM portátil (C). Posição da fibra óptica sob a superfície do sedimento (D). Medição de temperatura (E). 29
- Figura 4.** Procedimento laboratorial para a colheita de células pelo método do “*lens tissue*” (Eaton & Moss 1966). 30
- Figura 5.** Procedimento laboratorial para a realização das curvas de fluorescência em suspensões de microfitobentos. 31
- Figura 6.** Variação horária *in situ* da temperatura do sedimento (T, °C), salinidade (S, ups) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 14 de Julho de 2004. A barra cinzenta representa o período de preia-mar. 34
- Figura 7.** Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_o , u.a) (C), no dia 14 de Julho de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar. 35
- Figura 8.** Variação horária *in situ* da temperatura do sedimento (T, °C), salinidade (S, ups) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 27 de Julho de 2004. A barra cinzenta representa o período de preia-mar. 36
- Figura 9.** Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_o , u.a) (C), no dia 27 de Julho de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar. 37
- Figura 10.** Variação horária *in situ* da temperatura do sedimento (T, °C), salinidade (S, ups) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 17 de Julho de 2004. A barra cinzenta representa o período de preia-mar. 38
- Figura 11.** Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_o , u.a) (C), no dia 17 de Julho de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar. 39

Figura 12. Variação horária *in situ* da temperatura do sedimento (T, °C), salinidade (S, ups) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 14 de Novembro de 2004. As barras cinzentas representam os períodos de preia-mar. 40

Figura 13. Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_o , u.a) (C), no dia 14 de Novembro de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar. 41

Figura 14. Dois padrões de variação $\Delta F/F_m$ com a luz, durante o 1º período baixa-mar (manha) e o 2º período baixa-mar (tarde). Valores de $\Delta F/F_m$ no dia 14 de Julho de 2004 (A) e no dia 27 de Julho de 2004 (B). Cada ponto representa o valor médio de 2 réplicas e as barras representam 1 erro-padrão. 42

Figura 15. Resposta de $\Delta F/F_m$ à luz em amostras intactas de sedimento e em suspensões no dia 14 e 15 de Julho (A) e no dia 27 e 28 Julho (B). Cada ponto representa o valor médio de 2 réplicas e as barras representam 1 erro-padrão. 44

Figura 16. Exemplo de uma curva de ETR vs. E ajustada com o modelo Platt *et al.* (1980) usado para a determinação dos parâmetros α , ETR_m e E_k . 45

Figura 17. Exemplos de curvas de ETR vs. E (A) e NPQ vs. E (B), realizadas ao longo do dia 18 de Julho. 46

Figura 18. Variação com a luz (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de $\Delta F/F_m$ (A); ETR (B); NPQ (C) medidos em suspensões de microfitobentos em Julho e Novembro. Cada ponto representa o valor médio das curvas realizadas ao longo do dia e as barras representam 1 erro-padrão. 47

Figura 19. Percentagem relativa dos principais grupos presentes em suspensões de microfitobentos colhidas ao longo das duas campanhas de amostragem (Julho e Novembro). Para as diatomáceas apenas valores > 2% são apresentados. 49

Tabela 1. Notação utilizada neste estudo. 24

Tabela 2. Valores médios de parâmetros medidos nas curvas de ETR vs. E e de NPQ vs. E durante dois períodos semi-lunares, Julho e Novembro. Os números da tabela entre parênteses representam os valores de irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sobre os quais se mediu NPQ. Foram utilizados níveis de significância estatística de um teste t de "Student". 48

SÍMBOLOS e ABREVIATURAS

α, β	Declive inicial e parâmetro fotoinibitório ($\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^2 \text{s}$)
Chl a	Clorofila a
DD	Diadinoxantina
DT	Diatoxantina
$\Delta F/F'_m$	Rendimento quântico efectivo do PSII (sem unidades)
E	Irradiância (400 – 700 nm) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_k	Parâmetro de saturação da luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_{NPQmin}	Irradiância sob a qual NPQ atinge o valor mínimo
EPS	Substâncias polissacáridas extracelulares
ETR	Taxa de transporte de electrões
ETR_m	Taxa de transporte de electrões máxima
ETR_{rel}	Taxa relativa de transporte de electrões
$F'_{m m}$	Máximo F'_m medido sob irradiância baixa (unidades arbitrárias)
F_o, F_m	Fluorescência mínima e máxima de uma amostra adaptada ao escuro (unidades arbitrárias)
F_s, F'_m	Fluorescência máxima e em estado estacionário emitida por uma amostra adaptada à luz (unidades arbitrárias)
F_v/F_m	Eficiência máxima do PSII (sem unidades)
LHC	Complexos de antena
NPQ	Amortecimento não-fotoquímico da fluorescência (sem unidades)
NPQ (E)	NPQ medido sob irradiância E
PSI	Fotossistema I
PSII	Fotossistema II
q_E	Amortecimento reversível
q_I	Amortecimento fotoinibitório
q_P	Amortecimento fotoquímico da fluorescência
ups	Unidade padrão de salinidade

1.1 O microfitobentos estuarino

Os estuários são ecossistemas com elevada importância do ponto de vista científico. A elevada produtividade biológica destes sistemas confere-lhes um importante interesse ecológico, sendo há muito reconhecidos como dos mais produtivos da biosfera (Odum 1968). Nos sistemas estuarinos sujeitos à acção das marés, parte da produtividade primária deve-se à actividade fotossintética de comunidades de microalgas bênticas que habitam as zonas intertidais, denominadas genericamente por microfitobentos (MacIntyre *et al.* 1996). O microfitobentos estuarino é constituído predominantemente por microalgas pertencentes ao grupo das diatomáceas (Bacillariophyceae), embora outros grupos de microalgas como euglenófitas (Euglenophyceae) e cianobactérias (Cyanobacteria) possam também ocorrer (Underwood & Kromkamp 1999, Paterson & Hagerthey 2001). A ocorrência de movimentos verticais rítmicos de diatomáceas, formando à superfície do sedimento intertidal aglomerados durante o período de baixa-mar diurna é uma característica conspícua, da ecologia do microfitobentos das zonas intertidais (Round & Palmer 1966, Serôdio *et al.* 1997, Kingston 1999). As diatomáceas bênticas podem ser classificadas como epipsâmicas (formas aderentes aos grãos de sedimento) ou epipélicas (formas com vida livre que exibem capacidade de migração vertical, típicas dos sedimentos vasosos) (Round 1971, Admiraal 1984, Consalvey *et al.* 2004). Estas microalgas que colonizam os sedimentos intertidais segregam substâncias polissacáridas ricas em hidratos de carbono (EPS) (Smith & Underwood 1998, Staats *et al.* 2000). Os biofilmes microfitobênticos interagem na interface sedimento-água, na troca de nutrientes (Nedwell *et al.* 1999) e na bioestabilização do sedimento (Paterson 1989, Underwood & Paterson 1993, Paterson *et al.* 2000, Yallop *et al.* 2000, Orvain *et al.* 2003). Os sedimentos finos estuarinos possuem geralmente um elevado conteúdo de matéria orgânica, com elevadas taxas de mineralização bacteriológica e concentração de nutrientes dissolvidos, enquanto que, os sedimentos arenosos são mais oligotróficos (Admiraal 1984, Underwood & Kromkamp 1999). Segundo Underwood & Kromkamp (1999), de um modo geral, os nutrientes não são limitantes das taxas de fotossíntese em sistemas vasosos.

As zonas intertidais são caracterizadas pela sobreposição dos ciclos de maré e dia/noite, que forçam a variabilidade de parâmetros determinantes das taxas de fotossíntese, nas escalas de tempo horária, semi-lunar e sazonal (Serôdio *et al.* 1999). Em latitudes temperadas, os sedimentos intertidais podem ficar expostos a temperaturas

elevadas ($> 30^{\circ}$ C, Blanchard *et al.* 1996, Serôdio *et al.* 1999), podendo a temperatura da camada superficial facilmente variar 10° C durante o período de emersão (Harrison 1985).

Existem três factores principais que são referidos como reguladores da taxa de fotossíntese em microfitobentos: disponibilidade de luz (Barranguet *et al.* 1998, Perkins *et al.* 2001), temperatura (Blanchard *et al.* 1996, Guarini *et al.* 1997) e disponibilidade de CO_2 (Underwood & Kromkamp 1999). Contudo, as comunidades microfitobênticas intertidais conseguem manter taxas de fotossíntese muito elevadas, contribuindo para que as taxas de produção primária destas zonas sejam das mais elevadas da biosfera (MacIntyre *et al.* 1996). A manutenção deste desempenho fotossintético pelo microfitobentos estuarino, exige o recurso a diferentes processos fisiológicos que maximizem a actividade fotossintética. Por um lado o elevado desempenho fotossintético, requer uma elevada capacidade fotossintética, de forma a maximizar a utilização de energia pela via fotoquímica (Serôdio *et al.* 2005a); Por outro, o uso de mecanismos fotoprotectores para a dissipação de energia excessiva absorvida, impossível de ser utilizada fotoquimicamente, e que são denominados genericamente por mecanismos de amortecimento não-fotoquímico (NPQ). Em diatomáceas, este processo de NPQ consiste num mecanismo reversível rápido de dissipação de energia (q_E – amortecimento reversível) e em mudanças reversíveis lentas que envolvem danos no aparelho fotossintético (q_I – amortecimento fotoinibitório) (Quick & Horton 1984, Müller *et al.* 2001). O mecanismo de amortecimento reversível está associado ao ciclo das xantofilas. A regulação fotoprotectora da actividade do PSII envolve a operação do ciclo das xantofilas, com a conversão reversível rápida nos complexos de antena do fotossistema II (PSII) do pigmento diadinoxantina (DD) em diatoxantina (DT), diminuindo a transferência de excitações capturados para os centros de reacção (Olaizola & Yamamoto 1994). Ainda se verifica, a existência de mecanismos de reparação de danos causados no aparelho fotossintético pelo excesso de energia absorvida e não dissipada pela via não-fotoquímica, nomeadamente através da síntese *de novo* de proteína D1 destruída (Aro *et al.* 1993, Waring *et al.* 2006). A proteína D1 constitui uma das subunidades dos centros de reacção do PSII, que reactiva rapidamente devido a danos foto-oxidativos (Aro *et al.* 1993). Esta proteína é uma componente essencial do PSII e faz a ligação entre os primeiros dadores e aceitadores activos da cadeia de transporte de electrões do PSII. Por último, de forma a poder lidar com a variabilidade de irradiância disponível, muito variável ao longo dos ciclos de maré, estas comunidades apresentam uma elevada plasticidade no estado de fotoaclimação (Powles 1984, Prásil *et al.* 1992, Aro *et al.* 1993).

Os organismos fotossintéticos respondem à variabilidade de luz através da fotoaclimação, uma regulação fenotípica reversível, ajustando mudanças no conteúdo dos pigmentos componentes da cadeia de transporte fotossintético e no metabolismo de enzimas do ciclo de Calvin (MacIntyre *et al.* 2002). A fotoaclimação pode dar-se num intervalo de escalas de tempo, desde dias a poucos minutos, como ocorre no ciclo das xantofilas com a produção de pigmentos de dissipação de energia (MacIntyre *et al.* 2000, Müller *et al.* 2001). A contribuição relativa destes vários processos tem vindo a ser estudada em vários grupos de organismos fotossintéticos tais como ervas marinhas (Ralph *et al.* 1998, 2002b, Silva e Santos 2003), corais (Ralph *et al.* 1999, 2002a) microalgas do gelo (Kühl *et al.* 2001, Glud *et al.* 2002), macroalgas (Longstaff *et al.* 2002, Gévaert *et al.* 2003) e biofilmes microfitobênticos (Serôdio *et al.* 2005a). Nestes estudos, os resultados obtidos tem mostrado a ocorrência de variações rítmicas em vários parâmetros fotofisiológicos, que têm sido interpretados como adaptações à variabilidade periódica que caracteriza o ambiente intertidal.

1.2. Fluorometria de pulso modulado

A fluorometria de pulso modulado (PAM - “pulse amplitude modulated”) tem sido crescentemente utilizada para o estudo das comunidades de microalgas. Esta metodologia foi desenvolvida para o estudo da fotossíntese de plantas *in vivo*, introduzida por Schreiber *et al.* (1986), e tem sido cada vez mais utilizada em corais, ervas marinhas, macroalgas, fitoplâncton e microfitobentos estuarino. Recentemente, tem sido muito aplicada em microfitobentos estuarino, principalmente por possibilitar a medição de vários parâmetros de forma rápida e prática e pela natureza não-intrusiva das medições na amostra (Serôdio *et al.* 2001). Por outro lado, a natureza portátil de muitos fluorómetros, contribui para o aumento da viabilidade dos estudos realizados *in situ* (Consalvey *et al.* 2005). Os fluorómetros PAM medem a fluorescência (fracção de luz absorvida pelos pigmentos fotossintéticos que é re-emitida como luz vermelha) que é emitida como resposta a um feixe de luz excitação, feito incidir sobre a amostra por um feixe de fibras ópticas colocadas perto da superfície. A aplicação deste tipo de metodologia tem por pressuposto que, um incremento na Clorofila *a* (Chl *a*) superficial do sedimento, resultará num incremento proporcional na intensidade do sinal de fluorescência (Serôdio *et al.* 1997, Honeywill *et al.* 2002, Consalvey *et al.* 2005).

A fluorescência da Chl *a* é um indicador das reacções de fotossíntese que ocorrem nos cloroplastos e é um processo muito competitivo. Existem três tipos de complexos proteicos de clorofila nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos das microalgas: os complexos de antena (LHC), o fotossistema II (PSII) e o fotossistema I (PSI). Os diferentes processos que competem entre si e que reduzem a fluorescência são denominados genericamente por mecanismos de amortecimento. Podem ser distinguidos dois mecanismos diferentes de amortecimento: amortecimento fotoquímico (q_P), que diminui a fluorescência, transferindo excitações para a cadeia de transporte de electrões, e o amortecimento não-fotoquímico (NPQ), que envolve todos os mecanismos que não transferem energia para a cadeia de transporte de electrões (q_E e q_I) (Figura 1).

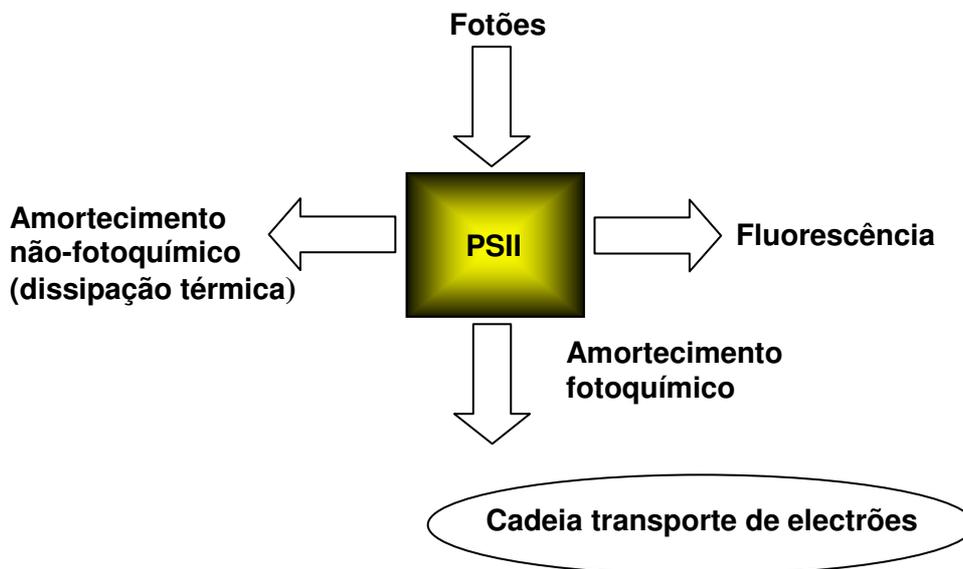


Figura 1. Diagrama esquemático dos mecanismos que regulam a actividade do PSII. O fluxo de fótons induzido pela energia de luz absorvida leva à competição de diferentes mecanismos: o amortecimento fotoquímico, a dissipação térmica e a emissão de fluorescência.

A fluorescência da Chl *in vivo* é originada principalmente pela Chl *a* no PSII. Quando uma amostra é adaptada ao escuro, os centros de reacção do PSII encontram-se “abertos” e o rendimento da fluorescência será mínimo (F_0) (ver Tabela 1) representando o rendimento da fluorescência na ausência de qualquer processo fotoquímico ou não-fotoquímico (Schreiber *et al.* 1986). Com a aplicação de um pulso de luz saturante os centros de reacção do PSII “fecham” provocando um aumento da

fluorescência até um valor máximo (F_m). A diferença entre F_o e F_m é denominada por fluorescência variável (F_v), e pode ser utilizada para determinar a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (ver Tabela 1). A fluorescência mínima (F_o) é frequentemente utilizada como indicador da biomassa produtiva microfitobêntica (Consalvey *et al.* 2004a). Vários autores encontraram uma relação linear entre a fluorescência mínima e a biomassa produtiva microfitobêntica em estudos laboratoriais e *in situ* (Schreiber *et al.* 1986, Serôdio *et al.* 1997, Barranguet & Kromkamp 2000, Serôdio *et al.* 2001, Honeywill *et al.* 2002).

Quando a fluorescência é medida sob condições de luz contínua os parâmetros F_s e F'_m são obtidos. A diferença entre F_s e F'_m pode ser utilizada para determinar o rendimento quântico efectivo do PSII, $\Delta F/F'_m$ calculado por (Genty *et al.* 1989):

$$\Delta F/F'_m = (F'_m - F_s) / F'_m \quad (1)$$

A taxa relativa de transporte de electrões, que é uma aproximação da taxa de transporte de electrões para a cadeia fotossintética, é calculada por (Genty *et al.* 1989):

$$ETR_{rel} = E \times \Delta F / F'_m \quad (2)$$

O amortecimento não-fotoquímico foi calculado através da expressão (Schreiber *et al.* 1994):

$$NPQ = (F'_{m\ m} - F'_m) / F'_m, \quad (3)$$

onde $F'_{m\ m}$ corresponde ao valor de F'_m máximo, medido sob irradiância baixa durante a curva de luz, devido à frequente ocorrência de valores de F'_m mais elevados que F_m .

Tabela 1. Notação utilizada neste estudo.

Parâmetros	Definições
α, β	Declive inicial e parâmetro fotoinibitório da curva de luz ($\mu\text{mol}^{-1} \text{m}^2 \text{s}$)
$\Delta F/F'_m$	Rendimento quântico efectivo do PSII (sem unidades)
E	Irradiância (400 – 700 nm) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_k	Parâmetro de saturação luminosa ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
E_{NPQmin}	Irradiância sob a qual NPQ atinge o valor mínimo

ETR	Taxa de transporte de electrões
ETR _m	Taxa de transporte de electrões máxima
F' _{m m}	F' _m máximo medido sob irradiância baixa (unidades arbitrárias)
F _o , F _m	Fluorescência mínima e máxima de uma amostra adaptada ao escuro (unidades arbitrárias)
F _s , F' _m	Fluorescência em estado estacionário e máxima emitida por uma amostra adaptada à luz (unidades arbitrárias)
F _v /F _m	Eficiência quântica máxima do PSII (sem unidades)
NPQ	Amortecimento não-fotoquímico da fluorescência (sem unidades)
NPQ (E)	NPQ medido sob irradiância E

1.3 Objectivos

Apesar da fluorometria PAM ter vindo a ser crescentemente utilizada em estudos sobre o microfitobentos estuarino, esta metodologia tem sido pouco utilizada em medições *in situ*, com amostras intactas de sedimento. O presente trabalho tem por primeiro objectivo o estudo *in situ* da actividade fotossintética do microfitobentos estuarino, com a obtenção de séries temporais *in situ* de elevada resolução, do rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F'_m$) e de parâmetros que caracterizam a biomassa produtiva (F_o). Embora a presença de ritmos migratórios no microfitobentos seja reconhecida como uma possível adaptação comportamental associada à fotoprotecção do aparelho fotossintético das microalgas bênticas (Kromkamp *et al.* 1998; Consalvey *et al.* 2004), a importância dos processos associados ao NPQ ainda não foi devidamente estudada para estas comunidades. Deste modo, este estudo tem ainda o objectivo de caracterizar o estado de fotoaclimação das comunidades microfitobênticas, da sua variabilidade nas escalas horária e sazonal, pela avaliação da variabilidade de parâmetros fotofisiológicos e comparando parâmetros caracterizadores da fotoaclimação.

CAPÍTULO 2.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de estudo

A Ria de Aveiro é o sistema estuarino mais extenso na Costa Noroeste de Portugal (40° 38' N, 8° 44' W), sendo o seu comprimento de 45 km e a sua largura de 10 km. Em marés vivas, a área coberta pela preia-mar é de 83 Km² sendo reduzida a 66 Km² em baixa-mar (Dias *et al.* 1999, Dias *et al.* 2000). A circulação da água na ria é causada principalmente pela propagação da maré. As marés são propagadas pelo canal da Barra, com cerca de 4000 m² de secção, e são de tipo semi-diurno com uma amplitude média de cerca 2 m (Cunha *et al.* 2003, Dias *et al.* 2000). A profundidade média deste sistema estuarino é de 1 m e a profundidade máxima, mantida artificialmente nos canais de navegação, varia entre 4 e 7 m. A Ria de Aveiro é um estuário com morfologia complexa e compreende um ecossistema muito produtivo caracterizado por um elevado número de estreitos canais e de zonas intertidais com elevado valor ecológico e económico (Dias *et al.* 2000). Os Canais de Ovar, Mira, Ílhavo e São Jacinto são os mais importantes neste sistema estuarino que recebe água doce vinda principalmente de dois rios, o rio Antuã e o rio Vouga. O estudo foi realizado no Canal de Ílhavo (40 ° 35 'N, 8° 41' W) (Figura 1). O local de amostragem situou-se próximo da Vista Alegre, num pequeno braço da margem esquerda do canal (Figura 1 B e C). O local é caracterizado por um baixo hidrodinamismo e está sujeito a um período de emersão que varia entre 6 a 7 h, ao longo do ciclo semi-lunar de marés. Em termos granulométricos, o sedimento é composto maioritariamente (90%) por partículas de dimensão inferior a 63 µm e representa um habitat característico das zonas intertidais, colonizado por comunidades de microfítobentos dominadas por diatomáceas sobretudo dos géneros *Navicula*, *Nitzschia* e *Gyrosigma* (Serôdio *et al.* 2005a).

2.2. Estratégia de amostragem

Para a realização deste estudo, foram efectuadas duas campanhas de amostragem ao longo de dois ciclos semi-lunares de maré. O primeiro período de amostragem decorreu entre 14 e 28 de Julho, e o segundo entre 8 e 21 de Novembro de 2004. Em cada período de amostragem o trabalho foi repartido em duas fases: (1) a realização de medições *in situ* durante fotoperíodos completos realizadas nos dias 14, 17, 20 e 27 de Julho e 8, 11, 14, 17 e 20 de Novembro e (2) a realização de experiências laboratoriais complementares no dia seguinte ao das medições *in situ*. Foram usadas

amostras intactas de sedimento durante as medições *in situ* e suspensões de microfitobentos nas experiências laboratoriais.

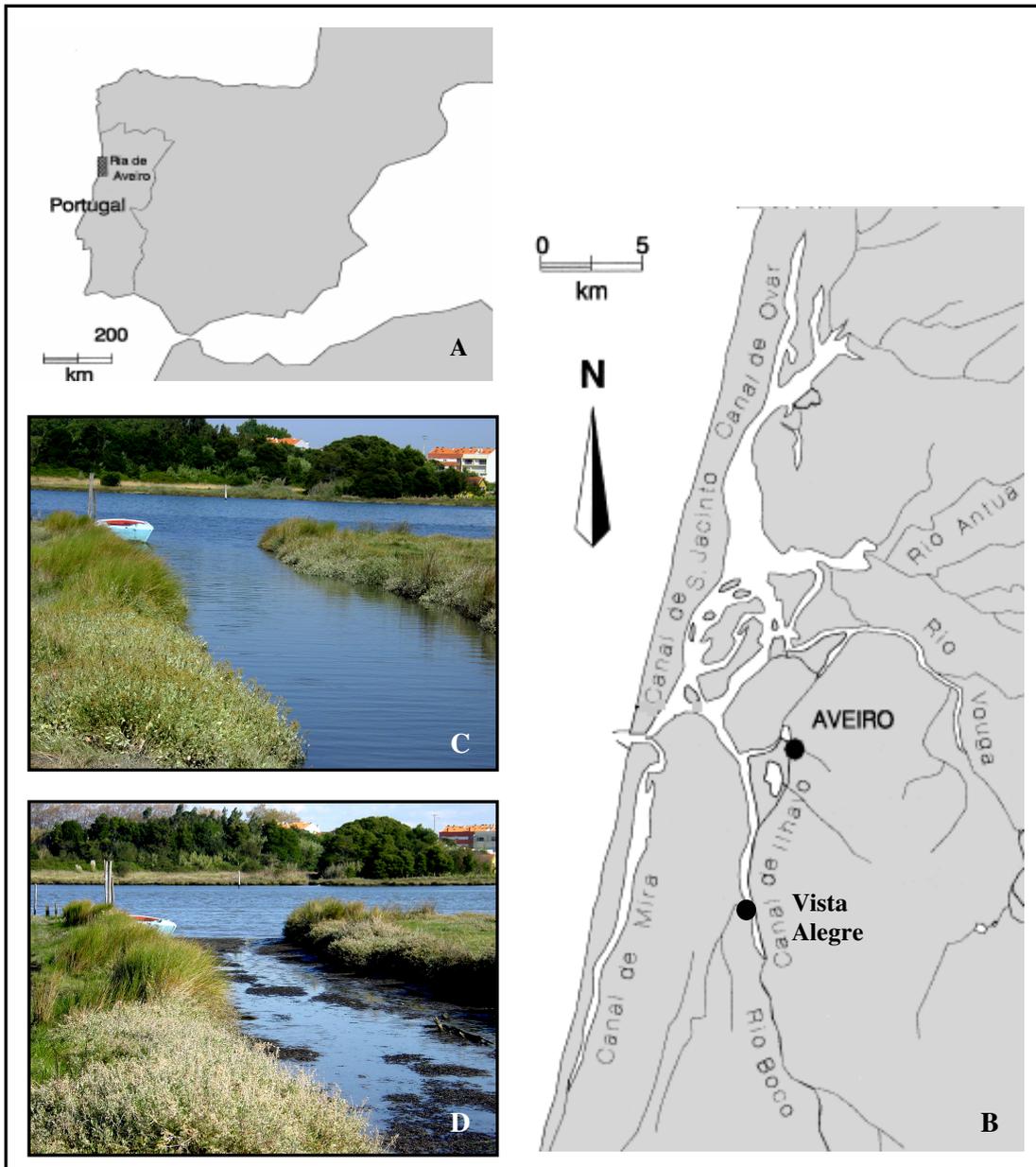


Figura 2. Localização e mapa da Ria de Aveiro com indicação do local de amostragem (A e B). Aspecto do local de estudo em preia-mar (C) e em baixa-mar (D).

2.3. Medições *in situ*

2.3.1. Sistema de medição

Em cada período semi-lunar consideraram-se dois tipos de dias: dias com a ocorrência de um único período de baixa-mar diurno (dias 23 e 27 de Julho e dias 11, 14 e 17 de Novembro) e dias com a ocorrência de dois períodos de baixa-mar diurnos (dias 14 e 17 de Julho e dia 8 de Novembro). As medições *in situ* foram efectuadas durante os períodos de baixa-mar, num sistema de medição montado na margem do canal. Este sistema foi constituído por quatro replicados de sedimento intacto (Figura 3 A e E). As medições de fluorescência efectuaram-se em três réplicas e as medições de parâmetros físicos (salinidade e temperatura) efectuaram-se na réplica restante, colocada nas mesmas condições que as anteriores. No local de amostragem as amostras de sedimento foram colhidas utilizando corers cilíndricos de plástico com 3,6 cm de diâmetro interno (Figura 3 F). Com o auxílio de um êmbolo o sedimento foi elevado até cerca de 1 cm da superfície do corer. Cada amostra foi colocada num recipiente com água e sob a superfície do sedimento fez-se incidir uma fibra óptica com uma posição fixa (inclinação de cerca de 45° e à distância de 1 mm da superfície do sedimento) (Figura 3 D), tentando assim manter as condições constantes ao longo de todo o período de medições *in situ*. Evitou-se o ensombramento sob a superfície das amostras. Nos dias constituídos por dois períodos de baixa-mar, as amostras de sedimento foram recolocadas no local de colheita, durante o período de preia-mar, permitindo assim utilizar as mesmas amostras de sedimento, na baixa-mar seguinte.

2.3.2. Medições de fluorescência

Para as medições de fluorescência *in situ* foi utilizado um fluorómetro PAM portátil (Junior-PAM, Gademan Instruments GmbH, Wurzburg, Alemanha), usando uma fibra óptica de 1,5 mm de diâmetro (Figura 3 C). O júnior PAM usa uma luz modulada azul (LED com pico de emissão a 470 nm em que metade da largura da banda é de 20 nm) como fonte de luz de excitação, saturante e actínica. Em cada amostra foi aplicado um pulso de luz saturante, com intervalos regulares de 15 minutos, de modo obter com elevada resolução, a variabilidade temporal de $\Delta F/F'_m$. Posteriormente ao pulso saturante, as amostras foram colocadas no escuro, durante 2 minutos e outro pulso foi aplicado, de

modo a obter a fluorescência mínima (F_0) e máxima (F_m) e a determinar a eficiência máxima do PSII (F_v/F_m).



Figura 3. Sistema de medição de parâmetros de fluorescência *in situ* com as diferentes réplicas (A). Colheita das amostras (B). Fluorómetro PAM portátil (C). Posição da fibra óptica sob a superfície do sedimento (D). Medição de temperatura (E).

2.3.3. Parâmetros físicos

Neste estudo, os parâmetros físicos medidos ao longo do período de medições *in situ* foram, a salinidade da superfície do sedimento (S , ups), a temperatura do sedimento (T , °C) e a irradiância incidente (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A salinidade e a temperatura foram registadas com intervalos de 30 minutos, enquanto que, para a irradiância os intervalos de medição foram de 15 minutos. Para a determinação da salinidade retirou-se uma gota de água da camada superficial do sedimento e usou-se um refractómetro ATAGO S/Mill. A temperatura da camada superficial do sedimento foi registada com um termómetro de mercúrio colocada sob a amostra (Figura 3 E) enquanto que a medição da irradiância foi medida usando um radiómetro (sensor PAR LI-193SA e LI-250 light meter, Li-Cor, Nebraska, E.U.A).

2.4. Experiências laboratoriais

2.4.1 Colheita das amostras

No início do período de baixa-mar colheram-se amostras da camada superficial de sedimento para tabuleiros e em seguida foram levadas para o laboratório. Aí, as microalgas bênticas foram recolhidas do sedimento usando o método do “*lens tissue*” (Eaton & Moss 1966). Os tabuleiros foram colocados sob irradiância constante de $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e foram colocadas porções de “*lens tissues*” (5x15 cm) na superfície do sedimento durante 30 minutos (Figura 4). Para a ressuspensão das porções de “*lens tissue*” foi utilizada água filtrada do local, obtendo deste modo a suspensão de microalgas. Previamente às medições de fluorescência a suspensão foi colocada numa câmara (Forma scientific Model 3744 S/N 34289-293), com um fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro, com temperatura constante de 20°C e irradiância de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Figura 4. Procedimento laboratorial para a colheita de células pelo método do “*lens tissue*” (Eaton & Moss 1966).

2.4.2. Medições de fluorescência

As medições de fluorescência efectuadas em suspensões foram realizadas usando um fluorómetro PAM, constituído por uma unidade de controlo (PAM –Control Unit, Walz, Effeltrich, Alemanha) e por uma unidade de emissão-deteção WATER-EDF-Universal (Gademann Instruments GmbH, Würzburg, Alemanha). Este instrumento usa uma luz modulada azul (LED com pico de emissão a 450 nm, em que metade da largura

da banda é de 20 nm) como fonte de luz de excitação, saturante e actínica (mais detalhes em Serôdio, 2004). As medições foram realizadas com uma fibra óptica de 1,5 mm de diâmetro ligada a uma cuvete de fluorescência (KS-101, Walz, Effeltrich, Alemanha) usando para isso um adaptador especial. As amostras foram mantidas a uma temperatura constante de 20° C, unindo a cuvete de fluorescência a um banho de recirculação de água (Frigiterm-10, Selecta, Espanha).

A resposta à luz foi caracterizada construindo em simultâneo curvas de ETR vs. E (curvas de luz em estado estacionário) e de NPQ vs. E, em suspensões de microfitobentos expostas a níveis crescentes de irradiância. Cerca de 1 ml da suspensão foi submetido a 30 minutos de adaptação ao escuro. Seguidamente, a amostra foi colocada na cuvete e submetida a níveis crescentes de luz actínica (desde 0 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a 1707 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

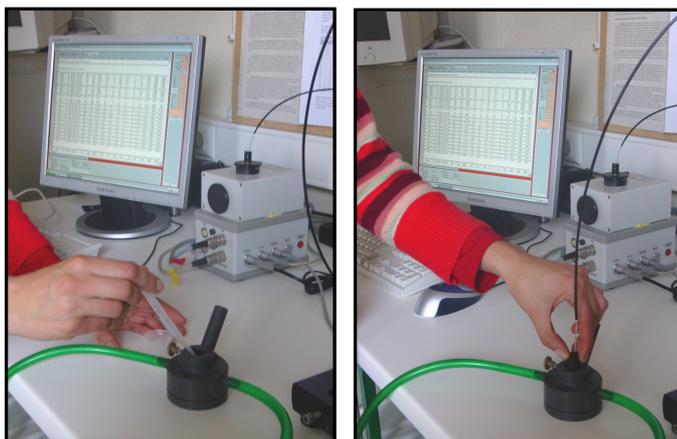


Figura 5. Procedimento laboratorial para a realização das curvas de fluorescência em suspensões de microfitobentos.

Inicialmente foram aplicados pulsos saturantes no escuro com intervalos regulares de 2 minutos; posteriormente, ligou-se a luz actínica no primeiro nível de irradiância e pulsos saturantes foram novamente aplicados sob esta iluminação, com intervalos de 90 s, até se atingir um estado estacionário de $\Delta F/F_m'$ (mínimo 7,5 minutos). Após se ter atingido um estado estacionário de $\Delta F/F_m'$, subiu-se a luz actínica para o segundo nível de irradiância e assim sucessivamente até ao último nível de irradiância.

Os parâmetros ETR_{rel} e NPQ foram determinados para cada nível de luz actínica utilizando as equações (2) e (3) respectivamente, e foram construídas curvas de ETR vs. E e NPQ vs. E. Às curvas de ETR vs. E, foi ajustado o modelo de Platt *et al.* (1980) e os parâmetros α (declive inicial da curva de luz), ETR_m (ETR máximo) e β (parâmetro

fotoinibitório) foram determinados para cada curva. O parâmetro de saturação luminosa E_k foi calculado através de $E_k = ETR_m/\alpha$. O modelo foi ajustado usando o programa “MS Excel Solver” e o ajuste das curvas foi bom ($r > 0,90$) em todos os casos. As curvas de NPQ vs. E foram caracterizadas pelos parâmetros: NPQ(0) (NPQ no escuro), NPQ(1700) (NPQ máximo) e $E_{NPQ \text{ min}}$ (a irradiância sob a qual NPQ atinge o valor mínimo). Estes dois tipos de curvas de fluorescência de luz foram realizadas duas ou três vezes ao longo do dia.

2.5. Composição taxonômica

Em cada período de amostragem, 5ml de sub-amostras das suspensões de microfitobentos foram fixadas com 1% v/v de formaldeído (gluteraldeído) para posterior determinação da composição taxonômica. Para a determinação da abundância relativa de diatomáceas, euglenófitas e cianófitas foi utilizado 1 ml da sub-amostra que foi colocada numa câmara de Sedgewick-Rafter (Electron Microscopy Sciences) e observada usando um microscópio óptico (100x, 400x), efectuando uma contagem de 400 células. A identificação das diatomáceas foi efectuada em preparações microscópicas definitivas preparadas por oxidação usando uma solução de permanganato de potássio saturada e ácido clorídrico concentrado. As espécies foram identificadas seguindo as descrições de Bourrelly (Bourrelly 1981), Hartley *et al.* (Hartley *et al.* 1996), Krammer e Lange-Bertalot (Krammer e Lange-Bertalot 1986,1988), Peragallo e Peragallo (Peragallo e Peragallo 1897) e Witkowski *et al.* (Witkowski *et al.* 2000). Para a determinação da percentagem relativa das diatomáceas foram contadas 400 valvas.

2.6. Tratamento estatístico

De modo a comparar os resultados obtidos em cada período de estudo (Julho e Novembro) foi utilizado o programa “Statistica 6.0” realizando um teste t de “Student” (Sokal & Rohlf 1981) entre os parâmetros obtidos nas curvas ETR vs. E e NPQ vs. E.

CAPÍTULO 3.

RESULTADOS

3.1. Variabilidade horária *in situ*

Neste ponto são apresentados os dados relativos a quatro dias de medições *in situ* representativos da gama de variação observada ao longo do período de estudo: os dias 14, 17 e 27 de Julho e o dia 14 de Novembro. As Figuras 4, 6, 8 e 10 apresentam a variação horária dos parâmetros físicos salinidade, temperatura e irradiância, e as Figuras 5, 7, 9 e 11 apresentam a variação horária dos parâmetros de fluorescência $\Delta F/F_m$, F_v/F_m e F_o .

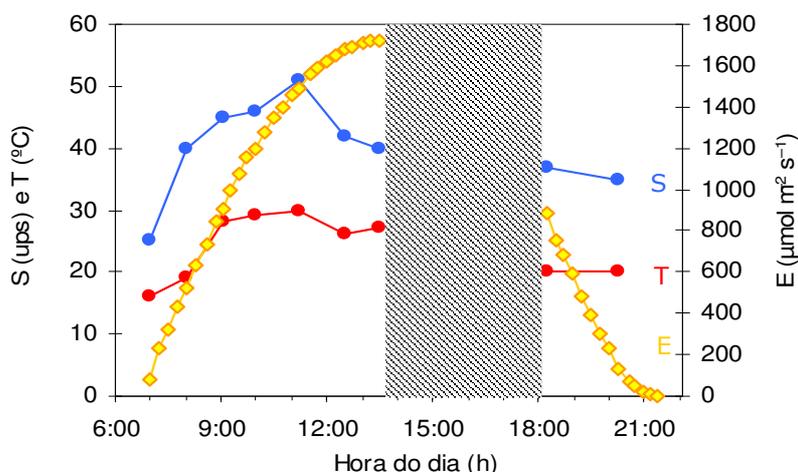


Figura 6. Variação horária *in situ* da temperatura (T , °C), salinidade (S , ups) e irradiância (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 14 de Julho de 2004. A barra cinzenta representa o período de preia-mar.

No dia 14 de Julho ocorreram dois períodos de baixa-mar diurnos, e verificou-se ausência de nebulosidade durante todo o dia. Ao longo deste dia, a irradiância aumentou atingindo o valor máximo cerca das 12h15m, e decresceu continuamente em seguida. No primeiro período de baixa-mar, os valores da irradiância aumentaram de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ até $1719 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, enquanto os valores da temperatura e salinidade atingiram o valor máximo aproximadamente a meio deste período. A temperatura e a salinidade do sedimento aumentaram gradualmente de 16 para $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e 25 para 51 ups, respectivamente, decrescendo de seguida. No segundo período de baixa-mar os valores de irradiância decresceram de $880 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para $0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ enquanto a temperatura se manteve constante a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, e a salinidade decresceu de 27 ups para 25 ups (Figura 6). No primeiro período de baixa-mar, os valores de $\Delta F/F_m$ e F_v/F_m diminuíram à medida que a irradiância aumentou (Figura 7 A e B). No início do dia, verificou-se para irradiâncias inferiores a $525 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que os valores de $\Delta F/F_m$ decresceram

ligeiramente, de 0,590 a 0,425 em média, enquanto que F_v/F_m permaneceu aproximadamente constante (variando de 0,655 a 0,620).

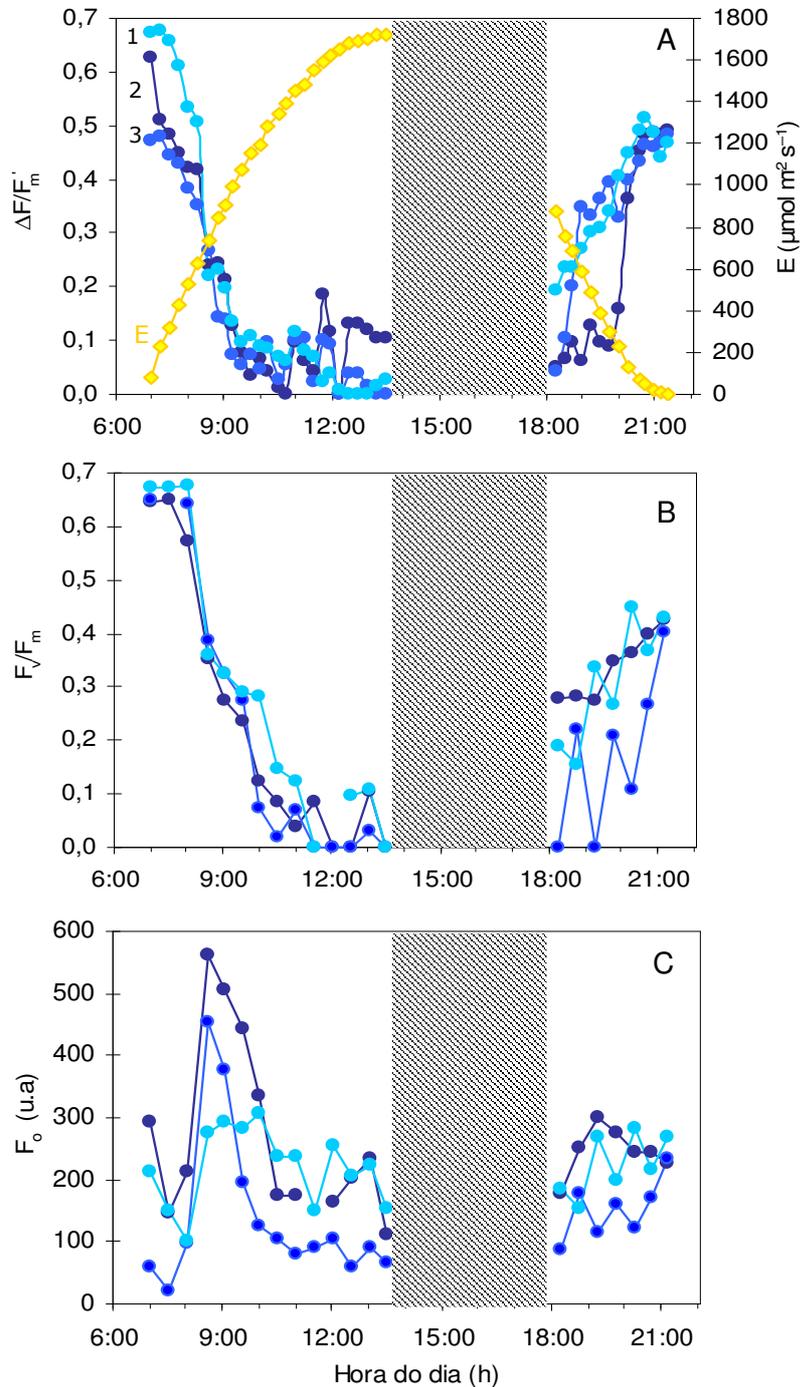


Figura 7. Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_o , u.a) (C), no dia 14 de Julho de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar.

Quando os valores de irradiância se encontraram no intervalo entre 525 e 1072 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ observou-se uma diminuição acentuada dos valores de $\Delta F/F_m$ e de F_v/F_m , de 41% e 55%, respectivamente, em relação ao valor medido no início do dia. Para irradiâncias superiores, os valores de $\Delta F/F_m$ e F_v/F_m mantiveram-se muito baixos, abaixo de 0,2 e 0,1, respectivamente. No segundo período de baixa-mar, os valores de $\Delta F/F_m$ e de F_v/F_m aumentaram, verificando-se uma maior variabilidade entre as três réplicas. No final do segundo período de baixa-mar os valores de $\Delta F/F_m$ atingiram 82% dos valores observados no início do dia e os valores de F_v/F_m atingiram 64% desse valor. No início do primeiro período de baixa-mar, verificou-se uma diminuição ligeira nos valores de F_o , correspondendo ao período em que os valores de F_v/F_m permaneceram aproximadamente constantes. A partir deste momento e para irradiâncias entre 525 e 620 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ os valores de F_o subiram acentuadamente, sendo o aumento médio de 228%, em relação ao valor medido no início baixa-mar (Figura 7C). Após este aumento, observou-se um decréscimo acentuado nos valores de F_o . No segundo período de baixa-mar, os valores de F_o aumentaram de um modo menos acentuado ao verificado no primeiro período de baixa-mar.

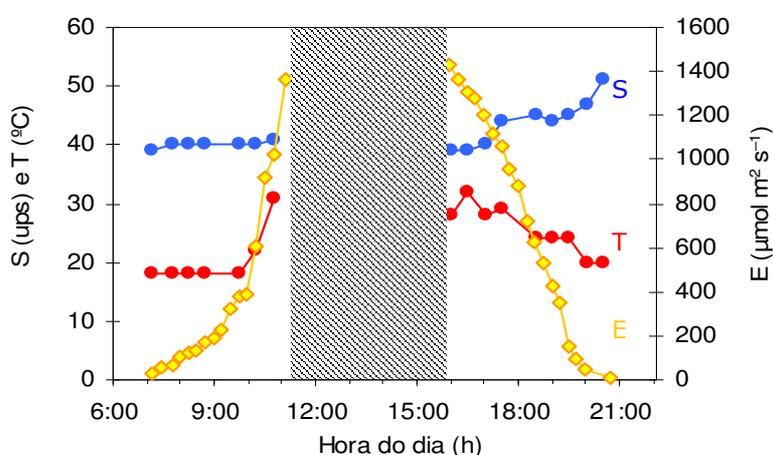


Figura 8. Variação horária *in situ* da temperatura (T, °C), salinidade (S, ups) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 27 de Julho de 2004. A barra cinzenta representa o período de preia-mar.

No dia 27 de Julho ocorreram dois períodos de baixa-mar, sendo este dia caracterizado pela ocorrência de nevoeiro durante parte da manhã. No primeiro período de baixa-mar, os valores da irradiância aumentaram de forma muito ligeira até às 10h00m, período durante o qual os valores da temperatura e salinidade permaneceram aproximadamente constantes (Figura 8).

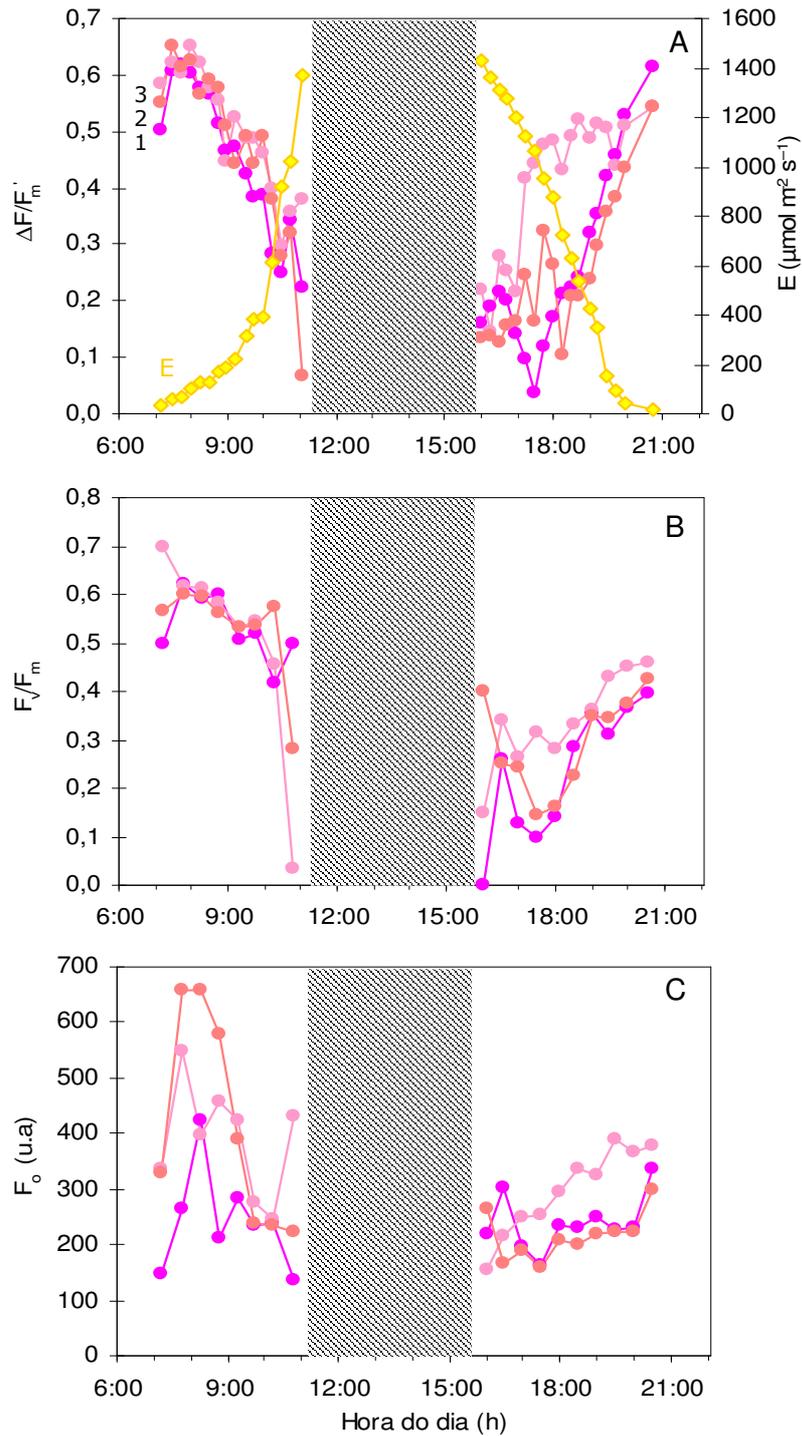


Figura 9. Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_o , u.a) (C), no dia 27 de Julho de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar.

A partir deste momento, a irradiância aumentou de uma forma muito acentuada, correspondendo ao desaparecimento da neblina matinal. A temperatura do sedimento

subiu até ao valor máximo de 21 °C e a salinidade permaneceu aproximadamente constante, variando entre 39 e 41 ups. No segundo período de baixa-mar, verificou-se que os valores de irradiância e temperatura diminuíram enquanto os valores de salinidade aumentaram (Figura 8). Ao contrário do verificado a 14 de Julho, neste dia observou-se uma subida dos valores de $\Delta F/F_m$, F_v/F_m e F_o no início do dia. A partir das 10h00m, quando a irradiância foi superior a $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, verificou-se um decréscimo acentuado dos parâmetros de fluorescência, que se manteve durante todo o período de baixa-mar (Figura 9 A e B). No segundo período de baixa-mar, os valores de $\Delta F/F_m$ aumentaram à medida que a irradiância diminuiu, verificando-se uma recuperação gradual até valores muito próximos dos observados no início do dia. Os valores de $\Delta F/F_m$ e F_v/F_m atingiram 104% e 75%, dos valores observados no início do dia, respectivamente. No segundo período de baixa-mar, os valores de F_o aumentaram gradualmente à medida que a irradiância aumentou, permanecendo inferiores aos valores observados durante a primeira baixa-mar. (Figura 7 C).

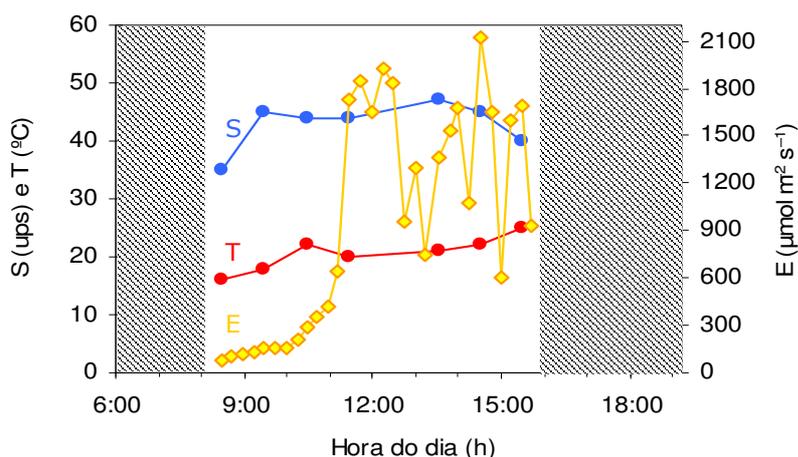


Figura 10. Variação horária *in situ* da temperatura (T, °C), salinidade (S, ups) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 17 de Julho de 2004. As barras cinzentas representam os períodos de preia-mar.

Contrariamente aos dias descritos anteriormente, no dia 17 de Julho ocorreu apenas um período de baixa-mar diurno. Neste dia, ocorreu nevoeiro durante a manhã, até cerca das 11h00m, e manteve-se alguma neblina ao longo de todo o dia. No início da baixa-mar os valores da irradiância apresentaram uma subida muito ligeira até cerca das 11h00m, seguida de uma subida súbita para valores muito elevados.

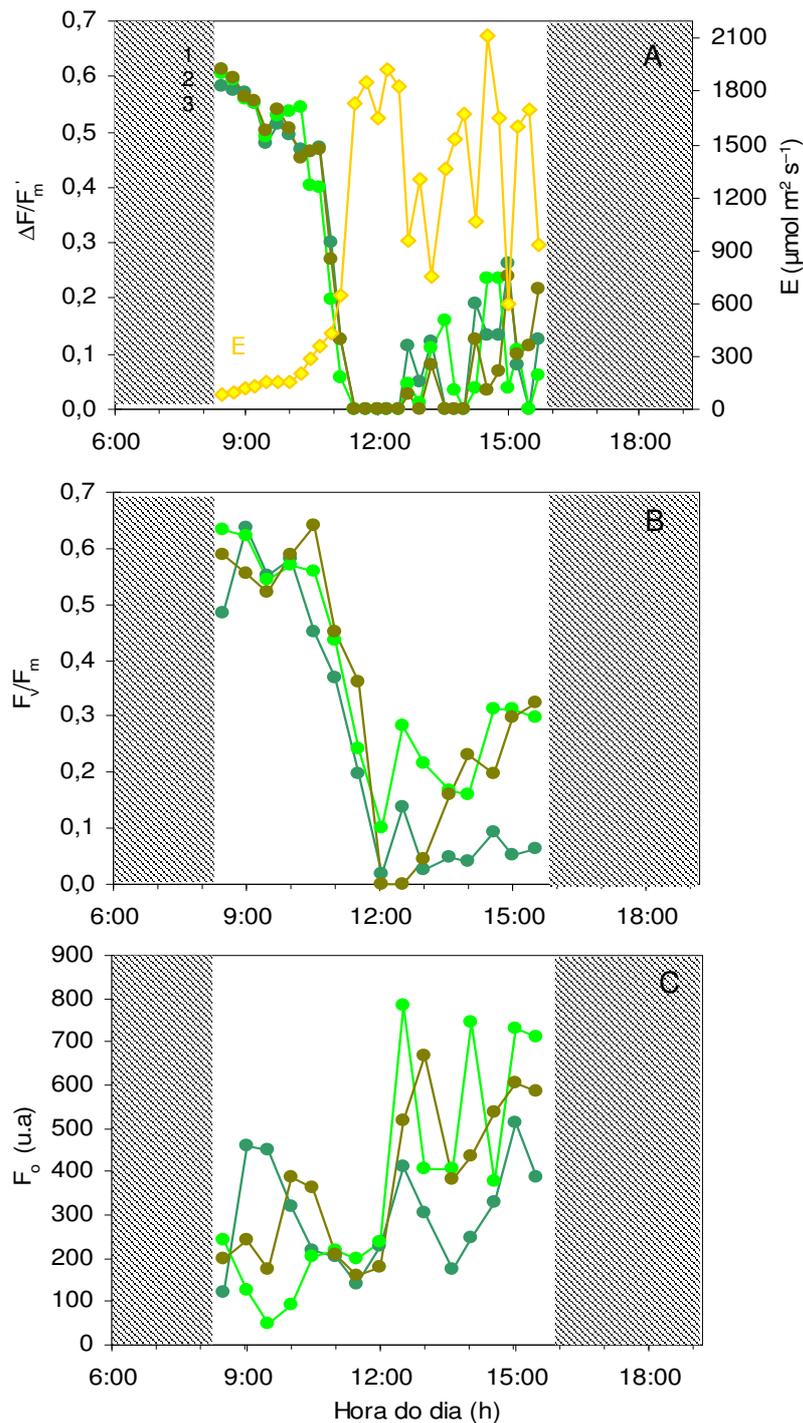


Figura 11. Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_0 , u.a) (C), no dia 17 de Julho de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar.

A partir deste momento, e devido a passagem de nuvens, os valores da irradiância oscilaram frequentemente entre 600 e 2015 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A temperatura aumentou gradualmente ao longo do tempo, sendo o aumento de 16 ° para 25 °C. A

salinidade no início da baixa-mar aumentou de 25 para 45 ups e em seguida apesar do aumento da temperatura os valores mantiveram-se aproximados, decrescendo no fim da baixa-mar para valores de 40 ups (Figura 10). Durante o período de baixa-mar verificou-se que, para valores de irradiância inferiores a $645 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ os valores de $\Delta F/F_m$ e de F_v/F_m decresceram de um modo pouco acentuado, verificando-se um decréscimo acentuado até atingir valores nulos à medida que a irradiância aumentou. Enquanto os valores de $\Delta F/F_m$ permaneceram nulos entre as 11h00 e 12h20m os valores de F_v/F_m foram ligeiramente superiores. Durante o período em que a irradiância oscilou observou-se uma variação rápida nos valores de $\Delta F/F_m$, mantendo-se abaixo de 0,2. Em relação a F_v/F_m , verificou-se um padrão semelhante ao de $\Delta F/F_m$ embora os valores F_v/F_m tenham sido ligeiramente mais elevados (Figura 11 A e B). Ao longo do dia, F_o apresentou valores muito variáveis observando-se uma subida progressiva dos valores ao longo do período de baixa-mar (Figura 11 C).

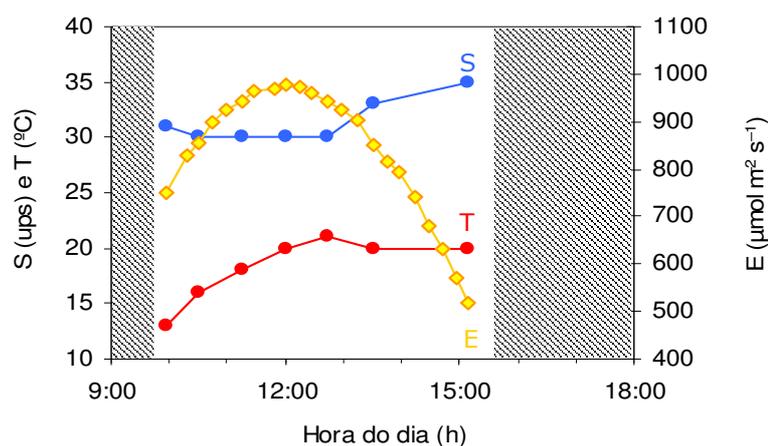


Figura 12. Variação horária *in situ* da temperatura (T, °C), salinidade (S, ups) e irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), no dia 14 de Novembro de 2004. As barras cinzentas representam os períodos de preia-mar.

O dia 14 de Novembro apresentou um único período de baixa-mar, e distinguiu-se do dia 17 de Julho pela ausência de nebulosidade. Neste período de baixa-mar a irradiância aumentou de $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ até um máximo de $942 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, decrescendo gradualmente de seguida até $520 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (valor registado no início da imersão). Os valores da temperatura aumentaram de $12 \text{ }^\circ\text{C}$ para $21 \text{ }^\circ\text{C}$ e mantiveram-se aproximadamente constantes até ao fim do período de baixa-mar. No início, os valores da salinidade mantiveram-se aproximadamente constantes a 30 ups, aumentando em seguida para valores de 35 ups (Figura 12). Apesar da ausência de nebulosidade os valores de $\Delta F/F_m$ e F_v/F_m foram muito variáveis ao longo do dia. Os valores de $\Delta F/F_m$ decresceram até valores nulos à medida que a irradiância aumentou, e aumentaram à

medida que a irradiância diminuiu. Em relação a F_v/F_m verificou -se o mesmo em duas réplicas (Figura 13 A e B). Os valores de F_o diminuíram ao longo do período de baixa-mar, sendo a diminuição mais acentuada no início da baixa-mar (Figura 11 C).

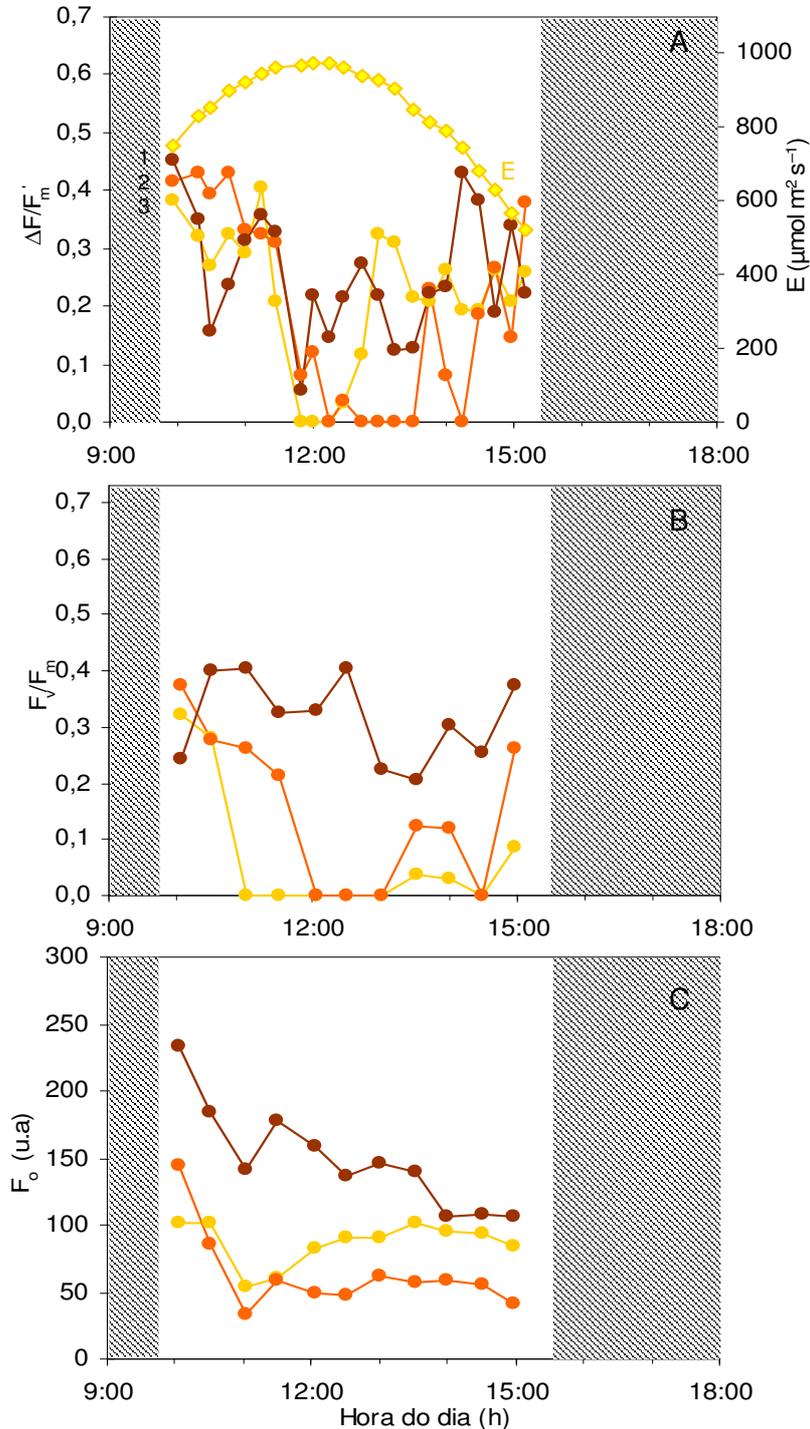


Figura 13. Variação horária *in situ* de: o rendimento quântico efectivo do PSII ($\Delta F/F_m$) e irradiância (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (A); a eficiência máxima de luz do PSII (F_v/F_m) (B) e a biomassa produtiva microfitobêntica (F_o , u.a) (C), no dia 14 de Novembro de 2004. Estão representados os valores de 3 réplicas (1, 2 e 3). A barra cinzenta representa o período de preia-mar.

3.2. Resposta à luz de $\Delta F/F'_m$

De forma a caracterizar a resposta à luz de $\Delta F/F'_m$, foram seleccionados os dados dos dias 14 e 27 Julho, constituídos por dois períodos de baixa-mar, de forma a avaliar a reversibilidade da diminuição dos valores de $\Delta F/F'_m$ sob irradiâncias altas.

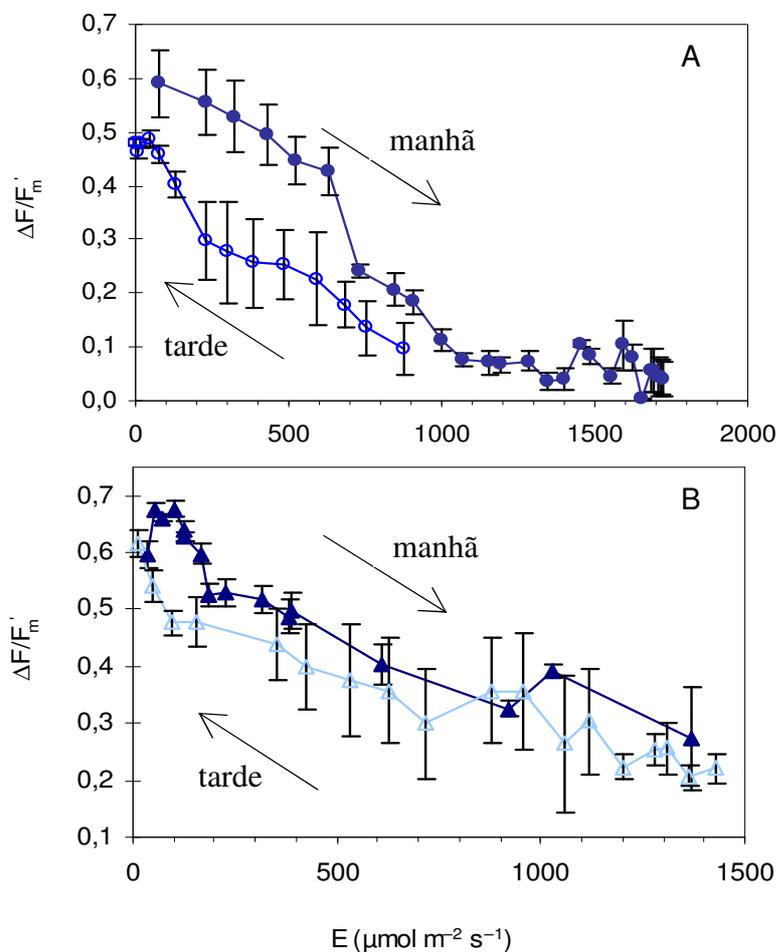


Figura 14. Dois padrões de variação $\Delta F/F'_m$ com a luz, durante o 1º período baixa-mar (manhã) e o 2º período baixa-mar (tarde). Valores de $\Delta F/F'_m$ no dia 14 de Julho de 2004 (A) e no dia 27 de Julho de 2004 (B). Cada ponto representa o valor médio de 2 réplicas e as barras representam 1 erro-padrão.

Durante o período da manhã do dia 14 de Julho, $\Delta F/F'_m$ apresentou um decréscimo pouco acentuado sob irradiâncias baixas mas bastante acentuado sob irradiâncias elevadas (irradiâncias superiores a $562 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), encontrando-se os valores de $\Delta F/F'_m$ abaixo de 0,1. Após o período de preia-mar, e à medida que a irradiância diminuiu, observou-se uma recuperação parcial dos valores de $\Delta F/F'_m$ em relação aos registados durante a manhã (Figura 14 A).

Foi verificada uma resposta diferente no dia 27 de Julho. Durante a manhã os valores de $\Delta F/F'_m$ apresentaram uma subida inicial, registada para irradiâncias inferiores a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, seguida de uma descida pouco acentuada, estando os valores de $\Delta F/F'_m$ acima de 0,2 (Figura 14 B). Neste dia e após o período de preia-mar verificou-se que os valores de $\Delta F/F'_m$ aumentaram à medida que a irradiância diminuiu para valores próximos aos obtidos no início da baixa-mar, sendo a recuperação destes valores também parcial mas encontrando-se mais próximos dos registados durante a manhã.

3.2. Resposta à luz de $\Delta F/F'_m$: sedimento vs. suspensões

Para comparar a resposta à luz de $\Delta F/F'_m$ entre amostras intactas e suspensões de microfitobentos foram comparados os resultados dos dias 14 e 27 de Julho, medidos *in situ*, com os obtidos no dia seguinte em condições laboratoriais constantes.

Foram consistentemente observados valores mais elevados de $\Delta F/F'_m$ em suspensões do que em amostras intactas (Figura 15 A e 15 B). Comparando os dados do dia 14 e 15 de Julho, verificou-se uma resposta semelhante quer em suspensões quer em amostras intactas para irradiâncias inferiores a $620 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 15 A). Sob irradiâncias superiores verificou-se uma resposta diferente, observando-se para suspensões um decréscimo quase linear nos valores de $\Delta F/F'_m$ entre $0,655 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $0,245$. Em sedimento intacto observou-se um decréscimo acentuado nos valores de $\Delta F/F'_m$, entre $0,590$ e $0,044$, mantendo-se estes inferiores a $0,1$ para irradiâncias superiores a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No dia 27 e 28 de Julho, verificou-se para irradiâncias inferiores a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, uma ligeira subida nos valores de $\Delta F/F'_m$ em amostras intactas, decrescendo de seguida de uma forma pouco acentuada, sendo a diminuição entre $0,546$ e $0,222 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Sob irradiâncias superiores a $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ estes valores mantiveram-se acima de $0,2$. Em suspensões, observou-se uma diminuição quase linear dos valores de $\Delta F/F'_m$ à medida que a irradiância aumentou, sendo esta diminuição de $0,624$ para $0,222 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

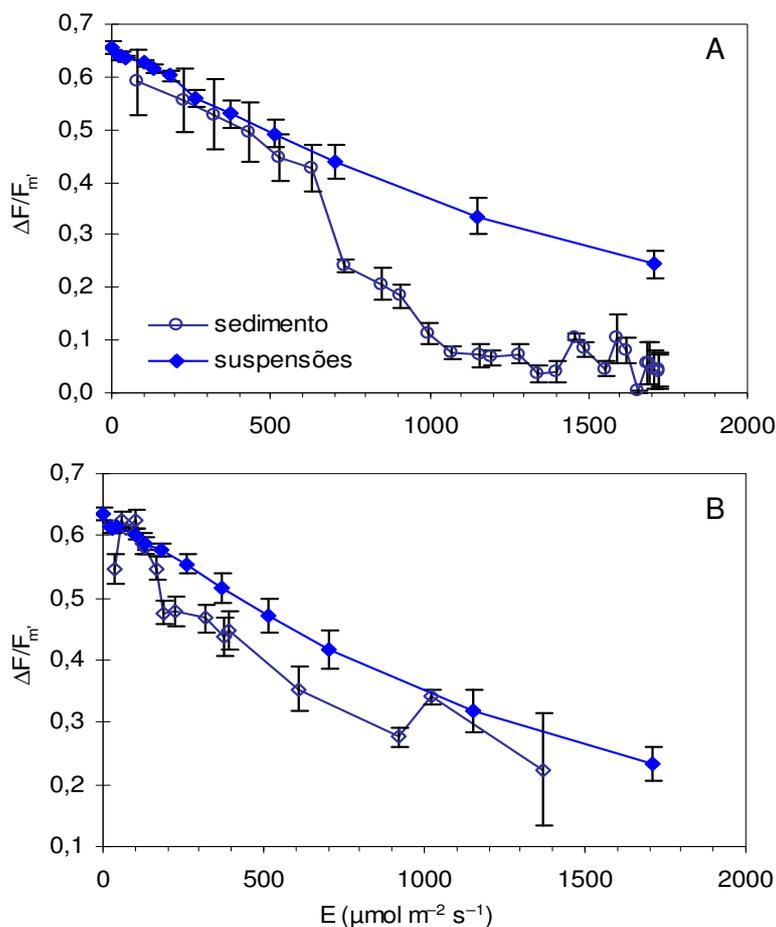


Figura 15. Resposta à luz de $\Delta F/F_m$ em amostras intactas de sedimento e em suspensões no dia 14 e 15 de Julho (A) e no dia 27 e 28 Julho (B). Cada ponto representa o valor médio de 2 réplicas e as barras representam 1 erro-padrão.

3.4. Variabilidade sazonal e estudo de fotoaclimação

Para caracterizar o estado de fotoaclimação das comunidades de microfitobentos e a sua variação à escala sazonal foram construídas em simultâneo curvas de ETR vs. E e de NPQ vs. E, descritas no capítulo anterior. As curvas ETR vs. E caracterizaram-se por um aumento linear nos valores de ETR para irradiancias inferiores a $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e por um aumento gradual desses valores até um valor máximo, atingido a $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A resposta à luz de ETR foi caracterizada pelos parâmetros α , ETR_m e E_k obtidos a partir das curvas de ETR vs. E. A cada curva foi ajustado o modelo Platt *et al.* (1980) (Figura 16). As curvas de NPQ vs. E caracterizaram-se por um decréscimo nos valores de NPQ sob irradiancia baixas e após um período de adaptação

ao escuro, até um valor mínimo ser atingido (E_{NPQmin}) e por um aumento linear desses valores com a irradiância até um valor máximo atingindo a $1700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 17).

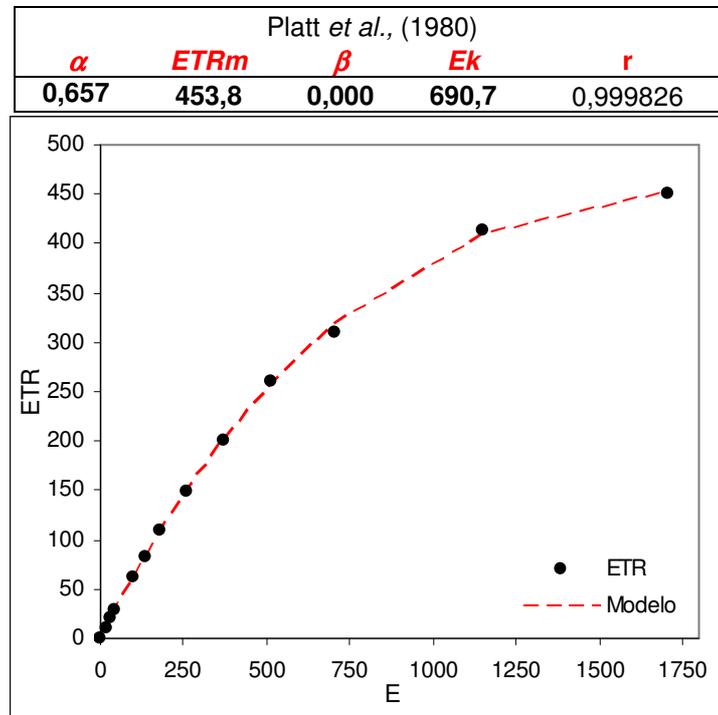


Figura 16. Exemplo de uma curva de ETR vs. E ajustada com o modelo Platt *et al.* (1980) usado para a determinação dos parâmetros α , ETR_m e E_k .

Apesar das curvas ETR vs. E e NPQ vs. E evidenciarem um padrão de variação semelhante, observou-se uma grande variabilidade ao longo do dia. De modo a ilustrar a variabilidade horária ao longo do período de estudo, foram utilizados como exemplo os dados do dia 18 de Julho (Figura 17). Neste dia, verificou-se que, apesar de os valores de ETR terem sido semelhantes para irradiâncias baixas, foram bastante diferentes sob irradiâncias elevadas, observando-se que o valor mais elevado de ETR foi obtido na curva de ETR vs. E às 14h20m (Figura 17A). Nas curvas de NPQ vs. E observou-se uma grande variabilidade quer nos valores de NPQ no escuro, NPQ(0), quer no valor máximo de NPQ, NPQ(1700) (Figura 18 B).

Durante os dois períodos de estudo verificou-se que em condições laboratoriais a resposta à luz de $\Delta F/F'_m$ evidenciou o padrão de variação típico, decrescendo de uma forma aproximadamente linear com o aumento da irradiância (Figura 18A). Em média, os valores de $\Delta F/F'_m$ foram mais elevados em Julho do que em Novembro. Em Julho, observaram-se igualmente valores médios mais elevados de α , ETR_m e E_k . Apesar dos dados sugerirem uma tendência em relação aos valores máximos destes parâmetros, em

que valores mais elevados foram alcançados em Julho, não se encontraram diferenças significativas entre os dois períodos de estudo (Tabela 2).

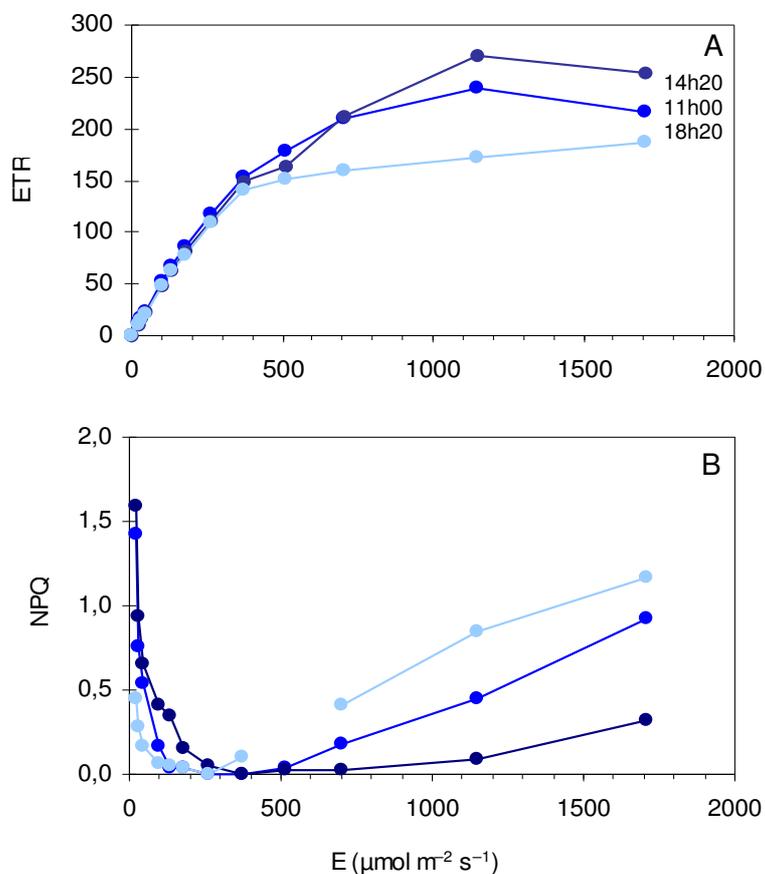


Figura 17. Exemplos de curvas de ETR vs. E (A) e NPQ vs. E (B), realizadas ao longo do dia 18 de Julho.

Nas curvas de NPQ vs. E, foram consistentemente observados valores mais elevados de NPQ no escuro do que os observados sob luz baixa (Figura 18 C). Todas as curvas mostraram valores elevados de NPQ no escuro que decresceram com a irradiância até ser atingido um valor mínimo (E_{NPQmin}). O valor médio foi de 178,5 e 125,7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em Julho e Novembro, respectivamente (Tabela 2). Os valores médios de NPQ(0) para Julho foram de 0,45 e para Novembro foram de 0,80. Para irradiâncias superiores a E_{NPQmin} , os valores de NPQ aumentaram linearmente com a irradiância atingindo um valor máximo a 1700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, que foi tipicamente mais elevado que os valores obtidos no escuro. Em Julho, o valor máximo de NPQ foi de 1,50 enquanto em Novembro foi de 3,42. Foram encontradas diferenças significativas entre Julho e Novembro nos valores de NPQ no escuro ($p < 0,05$) e nos valores máximos de NPQ

($p < 0,001$). Verificaram-se valores mais elevados em Novembro, sugerindo uma capacidade mais elevada para a operação de NPQ em Novembro (Tabela 2).

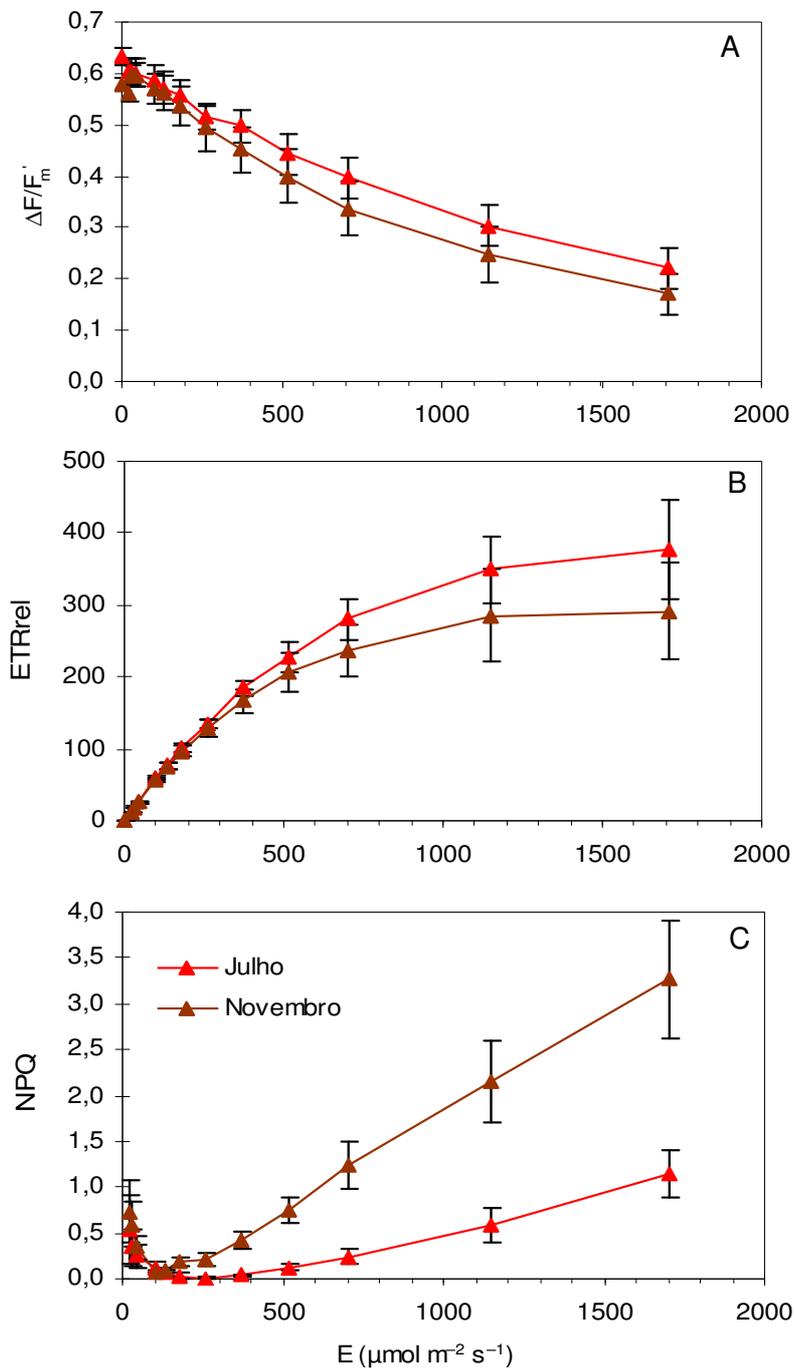


Figura 18. Variação com a luz (E , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de $\Delta F/F_m'$ (A); ETR (B); NPQ (C) medidos em suspensões de microfitobentos em Julho e Novembro. Cada ponto representa o valor médio das curvas realizadas ao longo do dia e as barras representam 1 erro-padrão.

Tabela 2: Valores médios de parâmetros medidos nas curvas de ETR vs. E e de NPQ vs. E durante dois períodos semi-lunares, Julho e Novembro. Os números da tabela entre parênteses representam os valores de irradiância (E, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sobre os quais se mediu o NPQ. Foram utilizados níveis de significância estatística de um teste t de “Student”.

Período de amostragem	ETR vs. E			NPQ vs. E		
	α	ETR _m	E _k	NPQ (0)	NPQ (1700)	E _{NPQmin}
Julho	0,606	375	619	0,45	1,50	178,5
Novembro	0,582	294	505	0,80	2,42	125,7
	ns	ns	ns	*	***	ns

3.5 Composição taxonómica

Ao longo dos dois períodos semi-lunares verificou-se uma mudança na composição taxonómica nas amostras de suspensões de microfitobentos (Figura 16). Em ambos os períodos de estudo a composição das amostras foi aproximadamente constante ao longo dos diferentes dias, sendo a variação máxima na abundância relativa das espécies individuais inferior a 5%. Em Julho, 87% do total da abundância relativa foi constituída por cinco espécies de diatomáceas: *Nitzschia frustulum* (Kützing) Grunow, *Nitzschia perspicua* Cholnoky, *Parlibellus crucicula* (W. Smith) Witkowski, Lange-Bertalot & Metzeltim, *Navicula cf. gregaria* Donkin e *Nitzschia draveillensis* Coste & Ricard. Em Novembro, o número de espécies com abundância relativa inferior a 2% aumentou para 10, e quatro destas também apresentaram uma abundância inferior a 2% no período de amostragem de Julho: *N. cf. gregaria*, *P. crucicula*, *N. frustulum* e *N. perspicua*. Neste período as amostras foram dominadas por *Gyrosigma fasciola* (Ehrenberg) Griffth & Henfrey, cuja abundância relativa variou entre 25.6 to 49.8 % e o seu valor médio de 41.5% do total de células contadas. Em Julho, o valor máximo de abundância destas espécies atingiu apenas 1,9%. As espécies com abundância inferiores a 2% foram *Nitzschia acuminata* W. Smith, *Entomoneis alata* (Ehrenberg) Ehrenberg, *Tryblionella apiculata* Gregory, *Navicula phyllepta* Kützing, e *Entomoneis paludosa* (W.Smith) Reimer, sendo que em todos os casos a abundância foi inferior a 7%. Nas duas campanhas de amostragem, euglenófitas (*Euglena sp.*) e cianobactérias (*Merismopedia sp.*, *Oscillatoria sp.*) ocorreram em menos de 1% da contagem total de células.

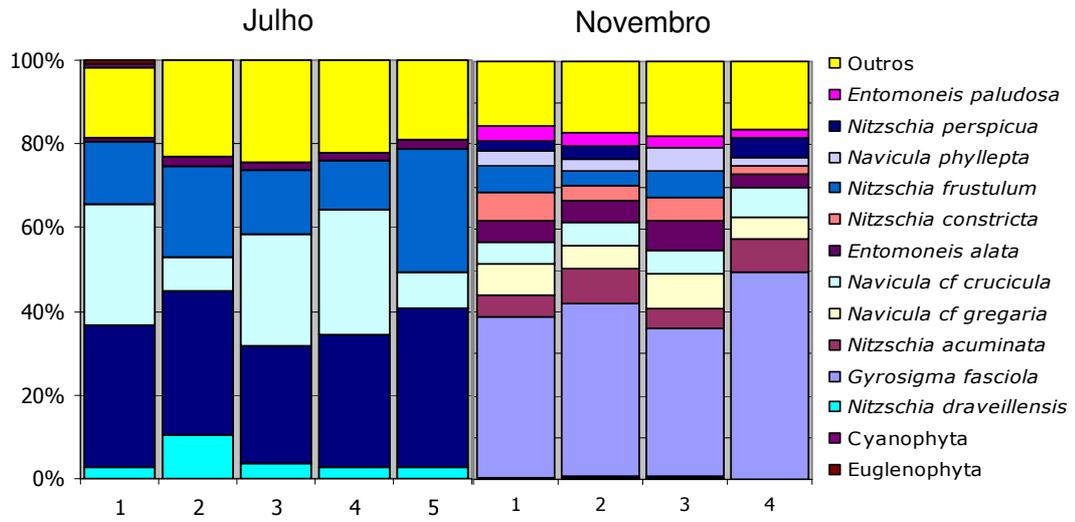


Figura 19. Percentagem relativa dos principais grupos presentes em suspensões de microfítobentos colhidas ao longo das duas campanhas de amostragem (Julho e Novembro). Para as diatomáceas apenas valores > 2% são apresentados.

CAPÍTULO 4.

DISCUSSÃO

4.1. Variabilidade horária *in situ*

De um modo geral, as zonas intertidais são caracterizadas por apresentarem uma grande variabilidade em factores físico-químicos tais como: irradiância, temperatura, salinidade e conteúdo em água do sedimento (Brotas *et al.* 2003). Neste estudo, ao longo dos dois ciclos semi-lunares, os parâmetros físicos medidos *in situ* (irradiância, temperatura e salinidade) apresentaram uma elevada variabilidade horária. Estes são factores que dependem das condições meteorológicas e que podem controlar o metabolismo das microalgas, influenciando as taxas fotossintéticas do microfitobentos, assim como, a resposta dos parâmetros de fluorescência medidos *in situ*. A magnitude destas mudanças está relacionada com a acção conjunta do tempo de exposição e das condições meteorológicas que determinam a natureza da troca de calor entre a atmosfera e o sedimento (Harrison & Phizacklea 1987).

Os parâmetros de fluorescência medidos *in situ* apresentaram uma elevada variabilidade horária nos dois períodos de estudo. A eficiência máxima do PSII, medida quando todos os centros de reacção estão “abertos”, é proporcional à fracção dos centros de reacção capazes de converter a luz absorvida em energia fotoquímica (Falkowski & Kolber 1993). Os valores médios de F_v/F_m , medidos no início do dia, em amostras intactas de microfitobentos, foram relativamente elevados (0,58 - 0,66) e próximos de valores de F_v/F_m observados em culturas (*Achnanthes longipes*, 0,83; *Amphora hybrida*, 0,71; *Navicula mutica*, 0,69; *A. coffeaeformis*, 0,58 – 0,60; *Cylindrotheca closterium* 0,7) (Rijstenbil 2003, Forster & Martin-Jézéquel 2005). Em diatomáceas valores de F_v/F_m próximos de 0,7 sugerem que as células se encontram em condições fisiológicas óptimas (Rijstenbil 2003). O rendimento quântico efectivo do PSII, é medido sob condições de luz contínua, de tal modo que, uma porção dos centros de reacção está “fechada”. Consequentemente, os valores de $\Delta F/F_m'$ tendem a ser inferiores aos valores de F_v/F_m .

O aumento da irradiância durante o período de baixa-mar leva a uma diminuição imediata de $\Delta F/F_m'$ e F_v/F_m . Diminuições nestes parâmetros têm sido associadas à indução de mecanismos fisiológicos fotoprotectores, associados ao amortecimento reversível (q_E) (Falkowski *et al.* 1994, Schofield *et al.* 1998, Ralph *et al.* 2002b) mediante o ciclo das xantofilas (Olaizola & Yamamoto 1994, Demming- Adams & Adams 1996). Os mecanismos fotoprotectores em diatomáceas estão associados ao ciclo das xantofilas, com a conversão reversível rápida do pigmento diadinoxantina (DD) em diatoxantina (DT) (Olaizola & Yamamoto 1994) induzindo, deste modo, o mecanismo de amortecimento não-fotoquímico mediante a dissipação térmica. Em amostras de campo, verificou-se que

os valores de $\Delta F/F_m'$ diminuem consistentemente a meio do dia, devido aos diferentes processos de amortecimento não-fotoquímico. A regulação da actividade do PSII foi também verificada em diferentes grupos incluindo *Sargassum* (Schofield *et al.* 1998), *Ulva* (Henley *et al.* 1991), corais (Ralph *et al.* 1999, Levy *et al.* 2004) e ervas marinhas (Ralph *et al.* 2002b).

Neste estudo, apesar de os resultados obtidos apresentarem o padrão de variação típico de $\Delta F/F_m'$ e F_v/F_m com a luz, observou-se também um decréscimo muito acentuado nestes parâmetros sob irradiâncias superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sendo este decréscimo mais elevado nos dias de sol. Este decréscimo acentuado nos parâmetros fotofisiológicos, estará possivelmente associado aos valores elevados de irradiância que se verificaram nestes dias, sendo esta diminuição uma resposta ao histórico luminoso das comunidades de microfitobentos e não apenas uma resposta à intensidade luminosa em cada momento. Por outro lado, o decréscimo acentuado corresponde ao momento em que se desencadeia a migração descendente das microalgas (verificada pela diminuição de F_o). Kromkamp *et al.* (1998) sugere que, durante a migração vertical das microalgas, possa ocorrer uma micro-migração nos primeiros milímetros do sedimento onde as algas da superfície migram para as camadas mais profundas de modo a prevenir a fotoinibição e a limitação de CO_2 , sendo substituídas por outras microalgas com melhores condições fisiológicas, o que resultaria num aumento de F_v/F_m . Segundo Seródio *et al.* (2005a) as microalgas apresentam um ritmo migratório endógeno, sincronizado com o ciclo de maré e dia/noite, em que se verifica uma migração vertical ascendente para a superfície do sedimento, durante os períodos de baixa-mar diurna. Este aumento nos valores de biomassa produtivo levou a um aumento nos valores F_v/F_m , e deveu-se também à presença de outras microalgas na superfície do sedimento. Por outro lado, os resultados obtidos recentemente por Seródio *et al.* (2006 no prelo) demonstraram em amostras intactas de sedimento, mantidas em condições laboratoriais, a diminuição de F_o e F_v/F_m , sob irradiâncias superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, o que está de acordo com os resultados obtidos *in situ*. Uma possível hipótese para o decréscimo acentuado de $\Delta F/F_m'$ e F_v/F_m corresponder ao momento de migração descendente das microalgas é, o facto de existirem diatomáceas que não exibem mobilidade não podendo, deste modo, desencadear um mecanismo de fotoproteção comportamental associado aos ritmos migratórios. Assim, estas espécies sem capacidades migratórias, estarão sujeitas a condições mais limitantes o que poderia ser responsável pela diminuição nos parâmetros fotofisiológicos *in situ*.

De forma a minimizar o efeito do histórico luminoso sob a amostra e a resposta migratória induzida pela adaptação ao escuro, F_v/F_m e F_o têm sido medidos usando curtos tempos de adaptação tais como: 2 (Seródio *et al.* 2005), 5 (Seródio *et al.* 2001) e de 15 minutos (Honeywill *et al.* 2002). Neste estudo, a ocorrência de valores de F_v/F_m inferiores aos medidos sob luz contínua permitem inferir que os 2 minutos não foram suficientes para o relaxamento total dos centros de reacção. Por outro lado, o decréscimo acentuado nos valores de F_v/F_m poderá também estar associado ao processo de fotoinibição, uma vez que danos ao nível da proteína D1 são acompanhados por diminuições na eficiência máxima do PSII durante o dia, sendo diferente de outros processos reguladores, como o ciclo das xantofilas (Gorbunov *et al.* 2001). Esta componente de fotoinibição (q_i) é um mecanismo de recuperação lenta que relaxa em horas e está tipicamente associado a danos ou mudanças nos centros de reacção do PSII (Krause *et al.* 1982, Walters & Horton 1991).

Após os períodos de preia-mar e à medida que a irradiância diminuiu, não se verificou uma recuperação completa nestes parâmetros. Os valores de $\Delta F/F_m'$ e F_v/F_m não atingiram os valores registados no início do dia, verificando-se uma recuperação parcial destes valores, sendo que a recuperação foi mais elevada nos dias em que ocorreu neblina durante a manhã. A rápida recuperação do rendimento quântico efectivo do PSII sugere que a resposta das microalgas sob intensidades luminosas elevadas está associada à regulação da actividade do PSII, evitando danos fotossintéticos que reduzem a fotossíntese por longos períodos (Henley *et al.* 1991, Osmond & Grace 1995, Jones & Hoegh-Guldberg 2001). A recuperação de F_v/F_m , estará associada ao rápido mecanismo reversível fotoprotector de dissipação de energia, q_E , que relaxa em poucos minutos e que está associado ao gradiente transtilacoidal de pH (Quick & Horton 1984, Müller *et al.* 2001). A diferença na resposta à luz verificada nestes dias poderá ter sido influenciada, por um lado, pelos efeitos cumulativos de irradiâncias crescentes e elevadas. Por outro lado, a alteração da comunidade na camada superficial da amostra também poderá ter sido responsável por esta diferença.

A medição de F_o permite a monitorização das variações de biomassa na superfície do sedimento (Seródio *et al.* 2001). Este parâmetro é o mais fiável para a avaliação da biomassa presente na zona fótica, considerando a contribuição para a fotossíntese integrada em profundidade (Seródio *et al.* 2001). Considerando que a emissão de fluorescência por unidade de Chl *a* depende do estado fisiológico das microalgas, F_o tem sido utilizado preferencialmente a outros parâmetros de fluorescência, uma vez que se verificou ser o menos afectado por factores ambientais (Seródio *et al.* 1997, 2001). A

medição de F_0 requer um período de adaptação ao escuro como pressuposto essencial para a utilização da fluorescência como indicador da biomassa superficial. Como já foi referido, o tempo de adaptação deve de ser mínimo de forma a prevenir a uma resposta migratória induzida pelo tempo de adaptação e que resultaria num decréscimo da biomassa superficial (Consalvey *et al.* 2004b). Os valores de F_0 , medidos ao longo deste estudo mostraram que, nos dias com ocorrência de dois períodos de baixa-mar houve um aumento substancial da biomassa produtiva, no início do dia (sob irradiâncias inferiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), correspondendo à migração vertical das microalgas para a superfície do sedimento, seguida de uma diminuição acentuada. As migrações têm sido documentadas como deslocações em direcção à superfície do sedimento no início dos períodos de baixa-mar diurnos e no sentido inverso com a aproximação da preia-mar ou noite (Round & Palmer 1966, Serôdio *et al.* 1997). A acentuada diminuição sob valores de irradiância superiores a $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ poderá ser interpretada como um mecanismo de fotoprotecção comportamental para intensidades luminosas elevadas (Serôdio *et al.* 2006 *no prelo*). Tem sido proposto que as microalgas bênticas estão adaptadas a responder a irradiância excessiva migrando para camadas mais escuras do sedimento (Round 1979, Admiraal 1984). No microfitobentos, o desenvolvimento de características de aclimação a luz baixa no ambiente onde a exposição directa ao sol ocorre diariamente, pode ser facilitada pela regulação da migração das microalgas (Serôdio *et al.* 2004). A capacidade de migração vertical das microalgas torna-as aptas a escolherem, sob condições limitantes impostas pela variabilidade espacial (luz, tempo de exposição, dessiccação, nutrientes) a condição óptima para a fotossíntese colocando-se ao longo do gradiente na zona fótica do sedimento (Admiraal 1984, Lamontagne *et al.* 1989, Kromkamp *et al.* 1998). Durante os períodos de emersão, as diatomáceas bênticas estão sujeitas a processos de dessiccação e danos por excesso de luz, causados por evaporação e intensidades luminosas elevadas. Nas zonas temperadas, a dessiccação e temperatura elevada são responsáveis pela redução da fotossíntese e biomassa do microfitobentos em sedimentos vasosos (Guarini *et al.* 1999). Deste modo, o desenvolvimento de um mecanismo comportamental, alternativo aos mecanismos fotofisiológicos, permite-lhes uma maior resposta às condições ambientais extremas *in situ*.

Neste estudo foi também comparada a resposta à luz de $\Delta F/F'_m$, entre suspensões de microalgas em condições laboratoriais constantes e sedimento intacto, *in situ*. Os resultados obtidos indicam claramente valores mais elevados de $\Delta F/F'_m$ em suspensões do que em sedimento intacto. Esta diferença, pode ser devida ao facto de, em condições naturais, existirem factores físico-químicos que podem ser limitantes da actividade

fotossintética destas comunidades, controlando o metabolismo das microalgas e sendo responsáveis pela diminuição acentuada de $\Delta F/F'_m$. Devido à intensa actividade biogeoquímica dentro da zona fótica do sedimento, as condições ambientais ao longo da camada superficial de sedimentos intertidais são na maioria dos casos adversas para a fotossíntese (Admiraal *et al.* 1982) sendo responsáveis pela diminuição dos valores dos parâmetros fotofisiológicos obtidos *in situ*. Para além destes factores que podem ter sido responsáveis pelas diferenças de $\Delta F/F'_m$ observadas, em condições laboratoriais constantes e *in situ*, outro factor associado à metodologia utilizada poderá ter influenciado os resultados obtidos. Em condições laboratoriais, o tempo de exposição sob cada nível de luz foi de 7,5 minutos a irradiância constante, enquanto que *in situ*, as amostras intactas de sedimento estiveram expostas a irradiância variável durante 15 minutos. Tendo em conta a elevada variabilidade nos parâmetros de fluorescência obtidos *in situ*, o efeito cumulativo de irradiância crescente e o recente histórico luminoso das microalgas, era de esperar que os valores de $\Delta F/F'_m$ obtidos *in situ*, apresentassem uma diminuição mais acentuada do que os obtidos em condições laboratoriais constantes. Isto está de acordo ao verificado neste estudo em que os valores mais elevados foram obtidos em condições constantes.

4.2. Resposta à luz de $\Delta F/F'_m$: efeito de histerese

Ao longo do dois períodos de estudo observaram-se consistentemente valores mais elevados de $\Delta F/F'_m$, sob o mesmo nível de irradiância, durante a manhã do que durante a tarde. A resposta assimétrica da actividade fotossintética sob os mesmos níveis de irradiância, durante a manhã *vs.* tarde tem sido denominado por efeito de histerese (Vollenweider & Nauwerck 1961, Vollenweider 1965, Muller 1976). Existem várias hipóteses para o mecanismo de histerese diário: (1) mudanças diárias da actividade fotossintética devido a ritmos circadianos; (2) mudanças diárias na disponibilidade de nutrientes e CO₂; (3) diminuições na fotossíntese devido à fotoinibição provocada por longos períodos de exposição a irradiâncias elevadas e (4) um aumento da fotorespiração durante a tarde (Falkowski *et al.* 1985 a,b). Em condições naturais, as algas estão expostas a mudanças diárias nas condições ambientais, particularmente irradiância e temperatura. A sincronização entre estes dois factores pode desencadear o fenómeno de histerese verificando-se uma elevada actividade fotossintética durante a manhã do que a verificada à tarde (Vonshak *et al.* 2001). Neste estudo, a depressão nos

valores de $\Delta F/F'_m$ durante a tarde pode ser devida ao efeito cumulativo de irradiâncias crescentes e elevadas e ao recente histórico luminoso destas comunidades. Como já referido no ponto anterior, esta diferença na resposta à luz poderá ter sido devida também à alteração da comunidade na camada superficial da amostra. O fenómeno de histerese varia com a composição taxonómica e de espécie para espécie (Levy *et al.* 2004). O efeito de histerese foi observado, através de medições de fluorescência da Chl *a* em vários estudos em corais (Ralph *et al.* 1999, Gorbunov *et al.* 2001, Lesser & Gorbunov 2001, Levy *et al.* 2004), mas ainda não tinha sido verificado para o microfitobentos estuarino, nomeadamente *in situ*.

4.3. Variabilidade sazonal e estudo de fotoaclimação

As comunidades de microalgas estão sujeitas a uma variabilidade sazonal significativa (luz, temperatura, nutrientes, composição taxonómica e do estado fisiológico das comunidades) estando adaptadas a um ambiente de condições extremas. Por outro lado, estas comunidades podem responder à variabilidade de luz através da fotoaclimação. A nível celular, a fotoaclimação pode ser atribuída a mudanças nos complexos de antena ou nos pigmentos que constituem os centros de reacção, pela quantidade total de pigmentos por célula, ou pela razão dos diferentes pigmentos ou em ambos (Richardson *et al.* 1983). Quando a resposta das microalgas muda em função da intensidade de luz, a aclimação do aparelho fotossintético ocorre resultando numa optimização da eficiência fotossintética destas comunidades. Sob luz baixa, este processo assegura que a taxa de fotossíntese máxima seja mantida, enquanto que, sob luz elevada, este processo ajuda a impedir danos fotofisiológicos (Defew *et al.* 2004).

Neste estudo, as curvas de resposta de fluorescência à luz são uma forma de caracterizar o estado de fotoaclimação de biofilmes de microfitobentos e estão a ser adoptadas como uma aproximação às curvas tradicionais de fotossíntese-luz (P-I) (Kromkamp *et al.* 1998, Barranguet & Kromkamp 2000, Perkins *et al.* 2002, Underwood 2002). Tendo em conta que as curvas de luz obtidas em amostras intactas de microfitobentos, podem ser influenciadas pelos ritmos migratórios naturais ou induzidos durante a própria curva (Perkins *et al.* 2002) associado ao efeito de integração em profundidade (Serôdio 2004, Forster & Kromkamp 2004), a caracterização do estado de fotoaclimação destas comunidades foi realizado utilizando suspensões de

microfitobentos, sendo deste modo, a resposta à luz interpretada como resultado de um comportamento apenas fisiológico.

Os resultados obtidos nas curvas de ETR vs. E foram consistentemente mais elevados em Julho do que em Novembro. Em Julho, as comunidades de microalgas apresentaram valores médios mais elevados do declive inicial da curva (α), da taxa máxima de transporte de electrões (ETR_m) e do parâmetro de saturação luminosa (E_k). O parâmetro α , consiste na taxa de fotossíntese por unidade de biomassa e por unidade de irradiância incidente e indica a eficiência de utilização de luz pela biomassa produtiva, sob irradiâncias baixas para a fixação do CO₂ (Kirk 1994).

Em Julho, os valores mais elevados de α indicariam uma maior eficiência de utilização da luz incidente provavelmente pela aclimação destas comunidades a condições de Verão. Por outro lado, as variações de α e ETR_m estão em conformidade com as mudanças nos níveis de irradiância predominante, durante o histórico luminoso recente, indicando uma grande plasticidade da resposta à luz com a rápida regulação de E_k. Isto está de acordo com o conceito de fotoaclimação através de mudanças em E_k semelhantes à irradiância predominante numa escala de tempo de horas a dias (Variação de E_k dependente de E, Behrenfeld *et al.* 2004). Tal está em conformidade com o verificado neste estudo, em que se observaram valores mais elevados nestes parâmetros em Julho do que em Novembro, em consequência de valores mais elevados de irradiância que se observaram no primeiro mês, estando de acordo com o conceito de aclimação. Um aumento nos valores de E_k é tipicamente observado como aclimação a irradiâncias elevadas, e dá-nos a indicação da irradiância sob a qual a energia é desviada da cadeia fotoquímica e dissipada termicamente (Henley 1993, Gévaert *et al.* 2002). Por outro lado, um aumento em ETR_m indica uma activação das enzimas, nomeadamente a RUBISCO. Contudo, entre Julho e Novembro, não foi encontrada uma variabilidade sazonal significativa para estes parâmetros, possivelmente devido à elevada variabilidade horária verificada nos valores absolutos dos parâmetros das curvas de ETR vs. E, que acabaria por influenciar os valores médios. Deste modo, apesar de não se verificarem diferenças sazonais significativas para ETR_m e E_k, os valores em Julho foram visivelmente mais elevados que os verificados em Novembro, sugerindo que, em Julho, as microalgas estariam fotoaclimatadas a irradiâncias elevadas.

Quando observámos os dados relativos aos parâmetros de fluorescência relacionados com a capacidade máxima de NPQ (NPQ(1700)) e NPQ no escuro (NPQ(0)), verificou-se uma variabilidade sazonal significativa entre os dois períodos de estudo. Em Novembro foram registados os valores mais elevados destes parâmetros,

sugerindo mudanças importantes na resposta fotoprotectora potencial, associadas à aclimação sob as condições de Inverno. Esta mudança sazonal na operação de NPQ, pode ser devida à variação do “pool” de pigmentos do ciclo das xantofilas (DD e DT), tendo em conta que o seu tamanho aumenta em resposta a temperaturas baixas. Esta resposta foi verificada quer em diatomáceas (Anning *et al.* 2001) quer em plantas superiores (Müller *et al.* 2001). A DD e a DT encontram-se presentes nos cloroplastos das diatomáceas e têm a capacidade de se converterem um no outro por acção da luz (sob luz elevada e no escuro a DD sofre de-epoxidação e converte-se em DT; sob luz baixa a DT sofre epoxidação e converte-se em DD) (Rowan 1989, Brotas 1995). Deste modo o aumento de NPQ observado em Novembro pode ter resultado do aumento do “pool” de DD, como consequência da aclimação a temperaturas baixas (Seródio *et al.* 2005b). A exposição directa à luz solar sob temperaturas extremas (muito baixas ou elevadas) pode provocar danos ao nível do aparelho fotossintético. A operação do ciclo das xantofilas é um processo enzimático, esperando-se que temperaturas baixas possam diminuir a resposta fotoprotectora das microalgas. O aumento de pigmentos no ciclo das xantofilas no Inverno, sob temperaturas baixas, torna-se assim vantajoso para as células microfitobênticas, realçando a sua capacidade de fotoprotecção e alcançando um elevado grau de de-epoxidação. Uma diminuição no tamanho do “pool” de DD pode ser esperado considerando os níveis baixos de irradiância que se verificaram em Novembro, bem como temperaturas baixas, uma vez que foi demonstrado em diferentes microalgas, que o conteúdo de DD aumenta com o aumento da irradiância (Casper-Lindley & Björkman 1998, Moisan *et al.* 1998, Meyer *et al.* 2000, Rijstenbil 2003). A capacidade para desenvolver NPQ no escuro tem sido considerada uma vantagem adaptativa, representando uma forma de prevenir, a degradação dos pigmentos do ciclo das xantofilas durante prolongados períodos de escuro. A formação de NPQ no escuro está associada ao gradiente transtilacoidal de pH que se forma no escuro e tem sido genericamente atribuído ao processo de cloro-respiração (Olaizola & Yamamoto 1994, Jakob *et al.* 2001). Por outro lado, considerando a mudança substancial na composição taxonómica observada entre Julho e Novembro, o aumento sazonal na capacidade de NPQ poderá ser interpretado como um processo de sucessão de espécies. Tal processo estaria associado a uma vantagem competitiva, por parte da população, com a aptidão de desenvolver uma elevada capacidade fotoprotectora. Embora o ciclo das xantofilas seja conhecido em diatomáceas, a de-epoxidação e epoxidação do ciclo das xantofilas, varia de espécie para espécie (Casper-Lindley & Björkman 1998).

Mudanças sazonais de temperatura, irradiância e salinidade têm provavelmente uma grande influência na composição de espécies epipélicas (Underwood 1994), variando nos estuários, devido à sazonalidade de nutrientes e diluição (Ogilvie *et al.* 1997). A alteração da comunidade de microalgas pode ter sido devida a causas que não estão relacionadas com a fotoproteção, e deste modo, o aumento da capacidade de NPQ, pode ser interpretado como o resultado da aptidão de muitas espécies, para a aclimação fisiológica a mudanças sazonais nas condições de luz e temperatura.

O padrão de variação das curvas de NPQ vs. E encontrado em microfitobentos, é semelhante à resposta de NPQ à luz verificada em cianobactérias (Campbell & Öquist 1996, Green & Oliver 2003). Porém, em cianobactérias, a variação de NPQ observada sob luz baixa, tem sido atribuída a um processo fisiológico, denominado por transição de estado, e que não ocorre nas diatomáceas (Owens 1986, Ting & Owens 1993, Lavaud *et al.* 2002a). Em ambos os casos, NPQ atinge um valor mínimo sob irradiâncias moderadas (E_{NPQmin}). Em cianobactérias foi encontrada uma relação entre E_{NPQmin} e o estado de fotoaclimação das microalgas (Campbell & Öquist 1996). A similaridade entre as curvas de NPQ vs. E nos dois grupos de microalgas e a determinação de E_{NPQmin} pelo valor de NPQ no escuro, ocorrendo o seu relaxamento sob luz baixa e o seu início sob luz elevada, são factores que podem estar associados à aclimação térmica ou fotoaclimação em biofilmes microfitobênticos dominados por diatomáceas, sugerindo a possibilidade de existência de uma relação semelhante, à verificada em cianobactérias. Apesar de não se ter observado diferenças sazonais significativas nos valores de E_{NPQmin} nos dois períodos de estudo, o valor médio mais elevado de E_{NPQmin} observado em Julho estaria de acordo com o que seria de esperar no caso de fotoaclimação a irradiâncias elevadas.

4.4. Implicações do estudo

Os estudos *in situ* são de extrema importância do ponto de vista científico, uma vez que nos permitem o estudo do comportamento das comunidades em condições naturais, difíceis por vezes de simular correctamente em laboratório. No que se refere ao microfitobentos estuarino, estas comunidades estão sujeitas a uma variabilidade temporal significativa nas escalas de tempo horária (irradiância, temperatura e salinidade), semi-lunar (marés-vivas, marés-mortas) e sazonal (variação sazonal de parâmetros ambientais, composição taxonómica e estado fisiológico das comunidades) (Serôdio *et al.*

2001). A obtenção de séries temporais *in situ* com elevada resolução, permite a caracterização adequada das taxas fotossintéticas destas comunidades, bem como a otimização de planos de amostragem. Por outro lado, é importante salientar a relevância deste estudo, uma vez que, ao nível do microfítobentos estuarino este é pioneiro nas medições de parâmetros de fluorescência *in situ* (obtenção de séries temporais com elevada resolução), sendo essencial para a caracterização do comportamento destas comunidades, devido à elevada variabilidade subjacente às zonas intertidais, quer ao nível espacial quer temporal. Este tipo de estudos, tem ainda um papel fundamental na modelação da produtividade primária destas comunidades. Modelos recentes têm referido a importância dos ritmos migratórios (variações de biomassa microfítobêntica) na quantificação das taxas instantâneas de fotossíntese integradas em profundidade, modelando-as em função da biomassa produtiva explícita (Guarini *et al.* 2000, Seródio e Catarino 2000) ou implicitamente (Pinckney e Zingmark 1993). A influência da variabilidade horária na biomassa produtiva é modelada em função dos ciclos solares e de marés, resultando na previsão de valores máximos de biomassa, coincidentes com o meio do dia, sob irradiância máxima (Pinckney & Zingmark 1993, Guarini *et al.* 2000, Seródio e Catarino 2000). Contudo, neste estudo, os resultados obtidos de biomassa produtiva microfítobêntica (F_0) indicam uma migração vertical ascendente registada no início do dia (sob irradiâncias baixas), e uma migração vertical descendente sob irradiâncias elevadas. Deste modo, os pressupostos usados para o padrão horário de biomassa em modelação devem ser revistos, tendo em conta a elevada variabilidade horária *in situ*, uma vez que podem traduzir uma simplificação do observado em condições naturais.

4.5. Conclusões

A utilização da fluorometria PAM permite a medição de vários parâmetros de uma forma rápida, quase instantânea, e tornou-se numa metodologia muito importante para caracterizar os padrões de variabilidade *in situ* das comunidades microfítobênticas em zonas intertidais. Contudo, a aplicação desta metodologia *in situ* envolve um conjunto de pressupostos (adaptação da amostra ao escuro) associados quer à medição dos parâmetros fotofisiológicos, quer à ecologia e dinâmica destes sistemas intertidais bem como as comunidades microfítobênticas. O uso desta metodologia *in situ* mostrou-se apropriado para caracterizar, com elevada resolução a variabilidade nas escalas horária e

sazonal das comunidades microfitobênticas. No presente estudo, verificou-se uma elevada variabilidade às escalas horária e sazonal nos parâmetros físicos bem como nos parâmetros fotofisiológicos e caracterizadores da biomassa. A realização deste estudo permitiu concluir que em condições naturais o histórico luminoso recente do microfitobentos estuarino tem um papel crucial na resposta fotossintética às variações de intensidade luminosa pelo microfitobentos estuarino. As comunidades microfitobênticas apresentaram ainda, uma resposta assimétrica da eficiência fotossintética onde é evidente o fenómeno de histerese com uma depressão nos valores de $\Delta F/F'_m$ registada à tarde. Neste estudo ainda se verificou uma variação sazonal no estado de fotoaclimação das microalgas e na capacidade de desenvolvimento de mecanismos de fotoprotecção. A variação sazonal na resposta à luz foi acompanhada por uma mudança substancial na composição taxonómica das amostras de microfitobentos, o que foi interpretado como resultado de alterações na resposta fotoprotectora associada à aclimação a condições de Inverno.

CAPÍTULO 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. Referências bibliográficas

Admiraal W (1984) The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. In: Round FE, Chapman DJ (editores) *Progress in Phycological Research* 3: 269-322

Admiraal W, Peletier H, Zomer H (1982) Observations and experiments on the population dynamics of epipelagic diatoms from an estuarine mudflat. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 14: 471-487

Anning T, Harris G, Geider R (2001) Thermal acclimation in the marine diatom *Chaetoceros calcitrans* (Bacillariophyceae). *Eur. J. Phycol.* 36: 233– 241

Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of photosystem II Inactivation, protein damage and turnover. *Biochem. Biophys. Acta* 1143: 113–34

Barranguet C, Kromkamp J, Peene J (1998) Factors controlling primary production and photosynthetic characteristics of intertidal microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* 173: 117- 126

Barranguet C, Kromkamp JC (2000) Estimating primary production rates from photosynthetic electron transport in estuarine microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* 204:39-52

Blanchard GF, Guarini JM, Richard P, Gros P and Mornet F (1996) Quantifying the short-term temperature effect on light-saturated photosynthesis of intertidal microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* 134: 309-313

Blanchard GF, Simon Bouhet B, Guarini JM (2002) Properties of the dynamics of intertidal microphytobenthic biomass. *J Mar Biol Assoc UK* 82: 1027–1028

Behrenfeld MJ, Prasil O, Babin M, Bruyant F (2004) In search of a physiological basis for covariations in light-limited and light saturated photosynthesis. *J Phycol* 40: 4–25

Bourrely P (1981) Les Algues d'eau douce. Tome II: Les Algues jaunes et brunes. Chrysophycées, Phéophycées, Xanthophycées et Diatomées. Edições Boubée. Paris 438pp

Brotas V, Risgaard-Petersen N, Serôdio J, Ottosen, L, Dalsgaard T, Ribeiro L (2003) *In situ* measurements of photosynthetic activity and respiration of intertidal benthic microalgal communities undergoing vertical migration. *Ophelia* 57: 13-26.

Brotas V (1995) Distribuição espacial e temporal do microfitobentos no Estuário do Tejo (Portugal): pigmentos fotossintéticos, povoamentos e produção primária. Tese de doutoramento, Universidade de Lisboa e Universidade de la Méditerranée. 144pp

Casper-Lindley C, Björkman O (1998) Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophylls-cycle pigments. *Photosynthetic Research* 56: 277-289.

Consalvey M, Jesus B, Perkins RG, Brotas V, Underwood GJC, Paterson DM (2004a) Monitoring migration and measuring biomass in benthic biofilms: the effects of dark/far-red adaptation and vertical migration on fluorescence measurements. *Photosynthetic Research* 81: 91-101

Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC (2004b) The ups and downs of life in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. *Diatom Research* 19: 181-202

Consalvey M, Perkins RG, Paterson DM, Underwood GJC (2005) PAM Fluorescence: a beginners guide for benthic diatomist. *Diatom research* 20: 1-22

Cunha M A, Dias J M, Almeida M A, Lopes J F and Alcântara F (2003) Fluxes of bacterioplankton between a tidal estuary and the sea: returning to the "Outwelling Hypothesis". *Aquatic Ecology* 37: 45-54

Campbell D, Öquist G (1996) Predicting light acclimation in cyanobacteria from nonphotochemical quenching of photosystem II fluorescence, which reflects state transitions in these organisms. *Plant Physiol.* 111: 1293– 1298

De Jong L & Admiraal W (1984) Competition between three estuarine benthic diatom species in mixed cultures. *Marine Ecology Progress Series* 18: 269-275

Demming-Adams B and Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis, Vol. 1. Amsterdam: Elsevier, 21–26.

Dias J M, Lopes J F and Dekeyser I (1999) Hydrological characterisation of Ria de Aveiro, Portugal, in early summer *Oceanologica Acta*, Vol22, N°5

Dias J M, Lopes J F and Dekeyser I (2000) Tidal propagation in Ria de Aveiro Lagoon, Portugal. *Physics, Chemistry and Earth (B)* Vol.25 N° 4:369-374

Eaton JW, Moss B (1966) The estimation of numbers and pigment content in epipellic algal populations *Limnol Oceanogr* 11: 584-595

Flameling IA, Kromkamp J (1998) Light dependence of quantum yields for PSII charge separation and oxygen evolution in eucaryotic algae. *Limnol Oceanogr* 43: 284–297

Falkowski PG, Kim Y, Kolber Z, Wilson C, Wirick C and Cess R (1992) Natural versus anthropogenic factors affecting low-level cloud albedo over the North Atlantic. *Science* 256: 1311-1313

Falkowski PG, Greene R, Kolber Z (1994) Light utilization and photoinhibition of photosynthesis in marine phytoplankton. In: Baker NR, Bowes J (eds) *Photoinhibition of photosynthesis: from molecular mechanisms to the field*. Bios Scientific, Oxford, pp 407–432

Falkowski PG, Kolber K (1993) Estimation of phytoplankton photosynthesis by active fluorescence *Internat Con. Explor. Sea. Symp.* 197: 92-103

Falkowski PG, Dubinsky Z, Santostefano G (1985a) Lightenhanced dark respiration in phytoplankton. *Verh Int Verein Limnol* 22: 2830–2833

Falkowski PG, Dubinsky Z, Wyman K (1985b) Growth-irradiance relationships in phytoplankton. *Limnol Oceanogr* 30: 311–321

Forster RM and Martin-Jézéquel VR (2005) Photophysiological variability of microphytobenthic diatoms after growth in different types of culture conditions *Phycologia* 44: 393-402

Forster RM and Kromkamp JC (2004) Modelling the effects of chlorophyll fluorescence from subsurface layers on photosynthetic efficiency measurements in microphytobenthic algae *Mar Ecol Prog Ser* 284: 9-22

Genty B, Briantais J-M Baker N R (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence *Biochim Biophys Acta* 990: 87-92

Gévaert F, Créach A, Davoult D, Migné A, Levasseur G, Arzel P, Holl A-C, Lemoine Y (2003) *Laminaria saccharina* photosynthesis measured in situ: photoinhibition and xanthophyll cycle during a tidal cycle. *Mar Ecol Prog Ser* 247: 43–50

Gévaert F, Créach A Davoult D, Holl A-C, Seuront L, Lemoine Y (2002) Photo-inhibition and seasonal photosynthetic performance of the seaweed *Laminaria saccharina* during a simulated tidal cycle: chlorophyll fluorescence measurements and pigment analysis. *Plant, Cell and Environment* 25: 859-872

Green DW, Oliver RL (2003) Using non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence to assess the light climate and growth rate of the cyanobacterium *Anabaena circinalis*. *Eur. Phycol.* 38: 113-122

Gorbunov MY, Kolber ZS, Lesser MP, Falkowski PG (2001) Photosynthesis and photoprotection in symbiotic corals *Limnol Oceanogr* 46: 75–85

Glud RN, Rysgaard S, Kühl M (2002) A laboratory study on O₂ dynamics and photosynthesis in ice algal communities: quantification by microsensors, O₂ exchange rates, ¹⁴C incubations and a PAM fluorometer *Aquat Microb Ecol* 27: 301-311

Guarini JM, Blanchard GF, Gros P, Harrison SJ (1997) Modelling the mud surface temperature on intertidal flats to investigate the spatio-temporal dynamics of the benthic microalgal photosynthetic capacity *Marine Ecology Progress Series* 153: 25-36

Guarini JM, Gros P, Blanchard GF, Bacher C (1999) Shortterm dynamics of intertidal microphytobenthic biomass. *Mathematical modelling. CR Acad Sci Ser 3 Sci Vie* 322: 363–373

Guarini JM, Blanchard GF, Gros P, Gouleau D, Bacher C (2000) Dynamic model of the short-term variability of microphytobenthic biomass on temperate intertidal mudflats. *Mar Ecol Prog Ser* 195: 291-303

Harrison SJ (1985) Heat exchanges in muddy intertidal sediments: Chichester harbour, West Sussex, England. *Estuar Coast Shelf Sci* 20: 477-490

Harrison SJ, Phizacklea AP (1987) Vertical temperature gradients in muddy intertidal sediments in the Forth estuary, Scotland. *Limnol Oceanogr* 32: 954-963

Henley WJ, Levavasseur G, Franklin LA, Lindley ST, Ramus J, Osmond CB (1991) Diurnal responses of photosynthesis and fluorescence in *Ulva rotundata* acclimated to sun and shade in outdoor culture. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 75: 19–28

Henley WJ (1993) Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J Phycol* 29:729–739

Honeywill C, Paterson DN, Hagerthey SE (2002) Determination of microphytobenthic biomass using pulse-amplitude modulated minimum fluorescence. *Eur J Phycol* 37:485-492

Jakob T, Goss R, Wilhelm C. 2001. Altered pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Plant Physiology* 158: 383–390

Jones RJ, Hoegh-Guldberg O (2001) Diurnal changes in the photochemical efficiency of the symbiotic dinoflagellates (Dinophyceae) of corals: photoprotection, photoinactivation and the relationship to coral bleaching. *Plant, Cell and Environment* 24:89-100

Krammer K & Lange-Bertalot H (1988) Bacillariophyceae. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H & Mollenhauer D (editores). Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ed. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart

Krammer K. & Lange-Bertalot H (1986) Bacillariophyceae. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H & Mollenhauer D (editores) Naviculaceae, Süßwasserflora von Mitteleuropa. Ed. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart

Krause GH, Verrotte C, Briantais JM (1982) Photo-induced quenching of chlorophyll fluorescence in intact chloroplasts and algae: resolution in two components. *Biochim Biophys Acta* 679: 116-124

Krause GH, Weiss E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313-359

Kromkamp J, Barranguet C, Peene J (1998) Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Mar Ecol Prog Ser* 162:45-55

Kolber Z, Zehr J, Falkowski PG (1988) Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiol.* 88: 923-929

Kühl M, Glud RN, Borum J, Roberts R, Rysgaard S (2001) Photosynthetic performance of surface-associated algae below sea ice as measured with a pulse-amplitude modulated (PAM) fluorometer and O₂ microsensors *Mar Ecol Prog Ser* 223: 1-14

Kirk JTO (1994) Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. Cambridge University Press Cambridge. 2: 1-509

Lamontagne I, Cardinal A, Fortier L (1989) Environmental forcing versus endogenous control of photosynthesis in intertidal epilithic microalgae. *Mar Ecol Prog Ser* 51: 177– 187

Longstaff BJ, Kildea T, Runcie JW, Cheshire A, Dennison WC, Hurd C, Kana T, Raven JA, Larkum AWD (2002) An in situ study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta) *Photosyn Res* 74: 281-193

Lavaud J, Rousseau B, van Gorkom H, Etienne A-L (2002) Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.* 129: 1398–1406

Levy O, Dubinsky Z, Schneider K, Achituv Y, Zakai D, Gorbunov MY (2004) Diurnal hysteresis in coral photosynthesis *Mar Ecol Prog Ser Vol.* 268: 105–117

Lesser MP, Gorbunov MY (2001) Diurnal and bathymetric changes in chlorophyll fluorescence yields of reef corals measured *in situ* with a fast repetition rate fluorometer *Mar Ecol Prog Ser* 212: 69 – 77

MacIntyre HL, Geider RJ, Miller DC (1996) Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats 1 Distribution, abundance and primary production *Estuaries* 19: 186-201

MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider RJ (2002) Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *Journal of phycology* 38: 17-38

MacIntyre HL, Kana TM, Geider RJ (2000) The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci* 5: 12–17

Meyer, A.A., Tackx, M., Daro, N., 2000. Xanthophyll cycling in *Phaeocystis globosa* and *Thalassiosira* sp.: a possible mechanism for species succession *J Sea Res* 43: 373-384

McMinn A, Ashworth C, Ryan K G (2000) In situ net primary productivity of an Antarctic fast ice bottom algal community. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 21:177–85

Mock T, Dieckmann GS, Haas C, Krell A, Tison J-L, Belem AL, Papadimitriou S, Thomas DN (2002) Micro-optodes in sea ice: a new approach to investigate oxygen dynamics during sea ice formation *Aquat Microb Ecol Vol.* 29: 297–306

Moisan TA, Olaizola M, Mitchell BG (1998) Xanthophyll cycling in *Phaeocystis antarctica*: changes in cellular fluorescence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 169: 113-121

Muller P, Li X-P, Niyogi K (2001) Non-photochemical quenching A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558 -1566

Muller P (1976) Die Primärproduktion des epilithischen Aufwuchses und des Phytoplanktons am Ufer des eutrophen Greifensees. *Juris, Zürich activity of coral tissues. Mar Biol* 141:639–646

Nedwell DB, Jickells TD, Trimmer M, Sanders R (1999) Nutrients in estuaries. *Adv Ecol Res* 29: 43–92

Odum EP (1968) A research challenge: evaluating the productivity of coastal and estuarine water. In: *Proceeding of the Second Sea Conference Univ Rhode Island*, 63-64pp

Olaizola M, Yamamoto HY (1994) Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30: 606–612

Orvain F, Galois R, Barnard C, Sylvestre A, Blanchard G, Sauriau PG (2003) Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm. *Microb Ecol* 45: 237–251

Osmond CB and Grace SC (1995) Perspectives on photoinhibition and photorespiration in the field: quintessential inefficiencies of the light and dark reactions of photosynthesis? *Journal of Experimental Botany* 46: 1351-1362

Ogilvie B, Nedwell DB, Harrison RM, Robinson A, Sage A (1997) High nitrate, muddy estuaries as nitrogen sinks: the nitrogen budget of the River Colne Estuary (United Kingdom). *Mar Ecol Prog Ser* 150: 217–228

Owens TG (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*: II Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol.* 80: 739-746

Paterson DM (1989) Short-term changes in the erodibility of intertidal cohesive sediments related to the migratory behaviour of epipelagic diatoms. *Limnology and Oceanography* 34: 223-234

Paterson DM, Hagerthey SE (2001) Microphytobenthos in contrasting coastal ecosystems: biology and dynamics. In: Reise, K. (Ed.) (2001) Ecological comparisons of sedimentary shores. Ecological Studies: analysis and synthesis 151:105-125

Paterson DM, Tolhurst TJ, Kelly JA, Honeywill C and 6 others (2000) Variations in sediment properties, Skeffling mudflat, Humber Estuary, UK. Cont Shelf Res 20: 1373–1396

Peragallo H e Peragallo M (1997-1908) Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins. Micrographie-Editeur. Grez-sur-Loing 491pp

Perkins RG, Oxborough K, Hanlon ARM, Underwood GJC, Baker NR (2002) Can chlorophyll fluorescence be used to estimate the rate of photosynthetic electron transport within microphytobenthic biofilms? Mar Ecol Prog Ser 228: 47-56

Perkins RG, Underwood GJC, Brotas V, Snow GC, Jesus B, Ribeiro L (2001) Responses of microphytobenthos to light: primary production and carbohydrate allocation over an emersion period Marine Ecology Progress Series 223: 101-112

Pinckney JL, Zingmark RG (1993) Modeling the annual production of intertidal benthic microalgae in estuarine ecosystems. J Phycol 29: 396-407

Platt T, Gallegos C L, Harrison WG (1980) Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton J Mar Res 38: 687-701

Powles SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light Annu Rev Plant Physiol 35: 15-44

Prasil O, Adir N, Ohad I (1992) Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. In: J Barber, eds, The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands 295-348pp

Quick WP, Horton P (1984) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplast: 2. Resolution of fluorescence quenching by redox state and the transthylakoidal pH gradient. Proc. R. Soc. Lond., B 220, 371– 382

Ralph PJ, Gademann R, Dennison W C (1998) *In situ* seagrass photosynthesis measured using a submersible, pulse-amplitude modulated fluorometer Mar Biol 132: 367-373

Ralph PJ, Gademann R, Larkum AWD, Schreiber U (1999) *In situ* underwater measurements of photosynthetic activity of coral zooxanthellae and other reef-dwelling dinoflellated endosymbionts Mar Ecol Prog Ser 180: 139-147

Ralph PJ, Gademann R, Larkum, AWD, Kühl M (2002a) Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues Mar Biol 141: 639-636

Ralph PJ, Polk SM, Moore KA, Orth RJ, Smith Jr WO (2002b) Operation of the xantophyll cycle in the seagrass *Zostera marina* in response to variable irradiance J Exp Mar Biol Ecol 251: 189-297

Rasmussen, M.B., Henriksen, K., Jensen, A., 1983. Possible causes of temporal fluctuations in primary production of the microphytobenthos in the Danish Wadden Sea. Mar. Biol. 73: 109-114

Rijstenbil J 2003 Effects of UVB radiation and salt stress on growth, pigments and antioxidative defence of the marine diatom *Cylindrotheca closterium*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 254: 37– 48

Round FE (1971) Benthic marine diatoms. Oceanography and Marine Biology Annual Review 9: 83-139

Round FE, Palmer JD (1966) Persistent, vertical-migration rhythms in benthic microflora: II. Field and laboratory studies of diatoms from the banks of the River Avon. Journal of Marine Biology Associated of UK 46:191-214

Rowan KS (1989) Photosynthetic Pigments of Algae Cambridge University Press. Cambridge.

Shofield O, Evens TJ, Millie DF (1998) Photosystem II quantum yield and xanthophyll-cycle pigments of the macroalga *Sargassum natans* (Phaeophyceae): responses under natural sunlight. *J Phycol* 34: 104–112

Schreiber U, Bilger W, Neubauer C (1994) Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, ED, Caldwell, MM (eds), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin 49– 70pp

Schreiber U, Schliwa U, Bilger W (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer *Photosynth Res* 10: 51-62

Serôdio J (2004) Analysis of variable chlorophyll fluorescence in microphytobenthos assemblages: implications of the use of depth-integrated measurements. *Aquatic Microbial Ecology* 36:137-152

Serôdio J, Catarino F (1999) Fortnightly light and temperature variability in estuarine intertidal sediments and implications for microphytobenthos primary productivity. *Aquatic Ecology* 33: 235–241

Serôdio J, Catarino F (2000) Modelling the primary productivity of intertidal Microphytobenthos: time scales of variability and effects of migratory rhythms. *Marine Ecology Progress Series* 192:13- 30

Serôdio J, Cruz S, Vieira S, Brotas V (2005b) Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of xanthophyll cycle in microphytobenthos *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 326: 157-169

Serôdio J, Silva JM, Catarino F (1997) Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using in vivo chlorophyll a fluorescence. *Journal of Phycology* 33: 542-553

Serôdio J, Silva JM, Catarino F (2001) Use of in vivo chlorophyll a fluorescence to quantify short-term variations in the productive biomass of intertidal microphytobenthos. *Mar Ecol Prog Ser* 218: 45-61

Serôdio J, Vieira S, Cruz S, Barroso F (2005a) Short-term variability in the photosynthetic activity of microphytobenthos as detected by measuring rapid light curves using variable fluorescence. *Marine Biology* 146: 903-914

Serôdio J, Coelho H, Vieira S, Cruz S (2006) Microphytobenthos vertical migratory photoresponse as characterised by light-response curves of surface biomass *Estuar Coast Shelf Sci* (no prelo)

Shaikh MA, Meadows A, Meadows PS (1998) Biological control of avalanching and slope stability in the intertidal zone. In: Black, K.S., Paterson, D.M. & Cramp, A. (eds) *Sedimentary Processes in the Intertidal Zone*, Geological Society, London, Special Publications, 139: 309-329

Silva J, Santos R, (2003) Daily variation patterns of seagrass photosynthesis along a vertical gradient *Mar Ecol Prog Ser* 257: 37-44

Smith DJ, Underwood GJC (1998) Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms, *Limnol. Oceanogr* 43:1578-1591

Sokal RR and Rohlf FJ (1981) *Biometry*, 2nd edition W H Freeman and Company, United States of America, pp 499-530

Staats N, Stal LJ, Mur LR (2000) Exopolysaccharide production by the epipellic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *J Exp Mar Biol Ecol* 249:13–27

Underwood GJC (1994) Seasonal and spatial variation in epipellic diatom assemblages in the Severn estuary *Diatom Research*. 9: 451-472

Underwood GJC (2002) Adaptations of tropical marine microphytobenthic assemblages along a gradient of light and nutrient availability in Suva Lagoon, Fiji *Eur J Phycol* 37: 449-462

Underwood GJC, Kromkamp J (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In: *Advances in Ecological Research* 29:93-153

Underwood GJC, Paterson DM (1993) Seasonal changes in diatom biomass, sediment stability and biogenic stabilization in the Severn Estuary. *J Mar Biol Assoc UK* 73:871–887

Walters RG, Horton P (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res* 27: 121-133

Waring J, Underwood GJC, Baker NR (2006) Impact of elevated UV-B radiation on photosynthetic electron transport, primary productivity and carbon allocation in estuarine epipellic diatoms. *Plant, Cell & Environment*. 29: 521

Witkowski A, Lange-Bertalot H e Metzeltin D (2000) Diatom flora of marine coasts I. In: Lange-Bertalot H (editor). *Iconographia Diatomologica Vol 7*. Edição Ganter Verlag. Ruggell 925pp

Yallop ML, de Winder B, Paterson DM, Stal LJ (1994) Comparative structure, primary production and biogenic stabilisation of cohesive and non-cohesive marine sediments inhabited by microphytobenthos. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 39: 565-582

Ting CS, Owens TG (1993) Photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol*. 101: 1323-1330

Vollenweider RA (1965) Calculative models of photosynthesis- depth curves and some implications regarding day rate estimates in primary production measurements. *Mem Ist Ital Idrobiol* 18:425–457

Vollenweider RA, Nauwerck A (1961) Some observations on the C-14 method for measuring primary production. *Verh Int Verein Limnol* 14:134–139

Vonshak A, Torzillo G, Masojidek J, Boussiba S (2001) Suboptimal morning temperature induces photoinhibition in dense outdoor cultures of the alga *Monodus subterraneus* (Eustigmatophyta). *Plant Cell Environ* 24:1113–1118