



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

Departamento de Ciências Agrárias

Fotobiologia de *Discosoma* sp.

“Efeito de diferentes regimes luminosos na
actividade fotossintética dos seus
dinoflagelados endosimbiontes
Symbiodinium sp.”

TESE DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA

Orientadores: Doutor Ricardo Calado & Doutor João Serôdio

Nuno André de Oliveira Ribau

Angra do Heroísmo

2010

Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica, realizado no Departamento de Biologia - Universidade de Aveiro. Sob orientação do Doutor Ricardo Calado e Doutor João Serôdio, investigadores do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM).

Agradecimentos

Aos meus orientadores, *Doutor Ricardo Calado* e *Doutor João Serôdio*, investigadores do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) – Departamento de Biologia – Universidade de Aveiro, pelo apoio prestado durante a realização do Mestrado.

À Universidade de Aveiro, por me ter proporcionado o desenvolvimento do Mestrado.

Ao *Dr. Rui Rocha*, aluno de doutoramento do CESAM, pela colaboração na montagem do sistema de suporte de vida e nas medições realizadas.

Ao *Doutor Moreira da Silva*, coordenador do Mestrado em Engenharia Zootécnica da Universidade dos Açores, pelo apoio prestado no Mestrado.

Aos meus pais, *Pedro Manuel* e *Lucinda de Fátima*, pelo amor, ajuda moral e material que me deram, ao longo de toda a minha vida.

À minha namorada e amiga *Sara Oliveira*, por ter acreditado em mim e me ter dado todo o apoio.

À minha tia e madrinha, *Dr.^a Edite Padilha*, na colaboração da revisão do texto e pelo estímulo e confiança.

E a todos os familiares, amigos e conhecidos que, directa ou indirectamente, me apoiaram.

Índice Geral

Índice	I
Índice de figuras	IV
Índice de tabelas	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Resumo / Palavras-chave	X
Abstract / Keywords	XI
I – Introdução	1
II – Pesquisa Bibliográfica	3
1. <u>Discosoma</u> sp.	3
1.1. Taxonomia	3
1.2. Anatomia	4
1.3. Reprodução	6
1.4. Habitat	7
1.5. Nutrição	9

2. Fotobiologia dos corais	10
3. Utilizações comerciais dos corais	13
3.1. Aquariofilia	13
3.2. Biotecnologia	15
III – Material e Métodos	17
1. Obtenção e propagação do material biológico	17
2. Manutenção em laboratório	18
3. Desenho experimental	23
4. Técnicas de monitorização e medição	25
4.1. Análise espectral de reflectância	26
4.2. Fluorometria de pulso modelado - PAM	29
5. Análise estatística	31
IV – Resultados	32
1. Análise espectral de reflectância	32
2. Fluorometria de pulso modelado - PAM	35
V – Discussão	36
1. Análise espectral de reflectância	36
2. Fluorometria de pulso modelado - PAM	39

3. Conclusão	41
VI – Considerações finais	42
Bibliografia	
Anexos	

Índice de Figuras

Fig. 1	Esquema de cnidócito.	5
Fig. 2	Exemplo de ciclo de vida de um Cnidário – Classe Scyphozoon (Fonte: Pechenik, 1996).	6
Fig. 3	Distribuição das comunidades de recifes de coral.	7
Fig. 4	Esquema de um dinoflagelado.	10
Fig. 5	(a) Ilustração do corte longitudinal (vista sagital; vista frontal); (b) fotografia do corte em laboratório.	17
Fig. 6	Sistema de suporte de vida (desactivado).	18
Fig. 7	a) Escumador e filtro de 100 micra (sentido esquerda/direita); b) Tanques com rocha viva	19
Fig. 8	Tanques com sistema de iluminação LED. Da esquerda para direita: iluminação 100% azul; 67% azul e 33% branca; 100% branca (sentido esquerda/direita).	20
Fig. 9	Testes para realizar as medições do Cálcio, Dureza Carbonada, Nitratos e Fosfatos.	21
Fig. 10	a) Sistema de purificação de água da rede pública; b) Unidade de Osmose Inversa.	22

Fig. 11	<i>Discosoma</i> sp. sob iluminação branca.	23
	a) Recuperação numa caixa de Petri com fragmentos de rocha viva;	
	b) Aclimatização - fragmentos colocados em “coral cradle”.	
Fig. 12	Distribuição dos <i>Discosoma</i> sp. pelos tanques de ensaio, com diferentes cores de iluminação. a) LED 100% branca; b) LED 67% azul + 33% branca; c) LED 100% azul.	24
Fig. 13	a) espectrorradiómetro USB2000;	27
	b) calibração do espectrorradiómetro com o branco padrão;	
	c) medição de um indivíduo <i>Discosoma</i> sp. (1 – painel de referência branco padrão; 2 – lâmpada de halogéneo; 3 – Fibra óptica).	
Fig. 14	Fluorómetro PAM (1 - unidade de controlo PAM; 2 - unidade de emissão-deteção Water-EDF-Universal).	30
Fig. 15	a) fotografia dos <i>Discosoma</i> sp. depois da realização das medições como o PAM (1 – caixa de Petri; 2 – fibra óptica;	31
	b) Esquema das medições efectuadas no <i>Discosoma</i> sp..	

Fig. 16	Espectro de reflectância das medições dos indivíduos do regime luminoso com LED branca. Valores médios unitários usando como referência o comprimento de onda - 750nm.	32
Fig. 17	Espectro de reflectância das medições dos indivíduos do regime luminoso com LED azul + branca (mista). Valores médios unitários usando como referência o comprimento de onda - 750nm.	33
Fig. 18	Espectro de reflectância das medições dos indivíduos do regime luminoso com LED azul. Valores médios unitários usando como referência o comprimento de onda - 750nm.	33
Fig. 19	Comparativo de valores médios e desvio padrão do NDVI em Pf nos tanques iluminados com as diferentes cores de LED (L.B – LED branca; L.A:B – LED azul+branca; L.A – LED azul).	34
Fig. 20	Comparativo de valores médios e desvio padrão do Fv/Fm em Pf dos tanques iluminados com as diferentes cores de LED (L.B – LED branca; L.A:B – LED azul+branca; L.A – LED azul).	35

Índice de Tabelas

Tabela I	Parâmetros físico-químicos padrão para a manutenção dos <i>Discosoma</i> sp..	21
Tabela II	Valores de Pf das medições Fv/Fm e NDVI.	Anexo I
Tabela III	Valores de Pi das medições Fv/Fm e NDVI.	Anexo II

Lista de abreviaturas

°C	Grau centígrado
Ca	Cálcio
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
D.F.	Degree of Freedom (graus de liberdade)
F	Teste F
Fig.	Figura
Fv/Fm	Rendimento quântico potencial (Fluorescência variável / Fluorescência máxima)
h	Hora
HQI	Hydrargyrum quartz iodide
KH	Dureza carbonatada
L	Litro
LED	Light Emmiting Diodes
m ³	Metro cúbico
ms	Milissegundo
NDVI	Normalized Difference Vegetation Index
nm	Nano metro
NO ₃	Nitratos
PAM	Pulse amplitude modulation

Pf	Ponto final
Pf _b	Ponto final do LED branca
Pf _{a+b}	Ponto final do LED azul e branca
Pf _a	Ponto final do LED azul
Pi	Ponto inicial
PO ₄	Fosfatos
ppm	Partes por milhão (parts per million)
ppt	Partes por milhar (parts per thousand)
PVC	Policloreto de Vinil
T ^a	Temperatura
µm	Micra
UV	Ultravioleta

Resumo

Este trabalho teórico/prático teve como objectivo avaliar aspectos fundamentais associados ao efeito de diferentes regimes luminosos na actividade fotossintética dos endosimbiontes presentes nos *Discosoma* sp. de pigmentação vermelha.

Para tal, fez-se pesquisa bibliográfica e, no campo prático, acompanhámos estes indivíduos em tanques de vidro, *ex-situ*, durante um período de 90 dias após a sua recuperação e aclimatização. A parte prática do trabalho decorreu nas instalações do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

As medições referentes à sua fotobiologia foram feitas recorrendo à utilização de um espectrorradiómetro, para obtenção dos índices NDVI (0,054 a 0,073) através da análise espectral de reflectância e de um fluorómetro PAM, para medição do rendimento quântico potencial (F_v/F_m) da clorofila viva (0,159 a 0,280). O NDVI quantifica a clorofila com base na absorção da luz visual, enquanto a fluorescência da clorofila viva tem como base a excitação dos pigmentos fotossintéticos. Comparámos os tanques iluminados com luz do tipo LED, cor branca, azul + branca e azul.

Dos resultados obtidos, podemos concluir que os indivíduos colocados no tanque do regime luminoso com LED de cor branca, proporcionaram um melhor desempenho fotossintético do endosimbionte no hospedeiro, enquanto os do regime cor azul + branca maior produção de fotossíntese dos endosimbiontes.

Palavras-chave: *Discosoma* sp.; Fotobiologia; *Symbiodinium* sp.; Reflectância espectral; Fluorescência.

Abstract

This theoretical/practical work aimed to assess key aspects associated with the effect of different light regimes on the photosynthetic activity of endosymbionts present in *Discosoma sp.*.

For that, research was carried out and at the practical level monitoring of these corals in glass tanks, *ex-situ* during 90 days after their recovery and acclimatization. The practical work took place in the buildings of the Centre for Environment Studies and the Sea (CESAM), Department of Biology, University of Aveiro.

Measurements were made using a spectroradiometer to obtain NDVI (0.054 to 0.073) by reflectance spectral analysis and a PAM fluorometer to measure the potential quantum yield (F_v / F_m) of living chlorophyll (0.159 to 0.280). NDVI measures the chlorophyll basing on the absorption of visual light, whereas living chlorophyll fluorescence is based on the excitation of photosynthetic pigments. We compared the tanks lit by white, blue + white and blue LED.

From the results obtained, we can conclude light regime with white LED provided a greater symbiotic activity between host and endosymbiont while the blue + white regime provided a greater yield of photosynthesis of the endosymbionts.

Keywords: *Discosoma sp.*; Photobiology; *Symbiodinium sp.*; Spectral reflectance, Fluorescence.

“As doutrinas expressas são da responsabilidade do autor”

«Se tu tens uma maçã e eu outra ao trocarmos essas maçãs, então eu e tu teremos apenas uma maçã. Mas se eu tenho uma ideia e tu outra ao trocarmos as nossas ideias, então cada um de nós terá duas ideias.»

(George Bernard Shaw)

I. Introdução

No mundo em que vivemos pode encontrar-se uma enorme variedade de animais, quer na terra, no ar e também na água. Identificados e descritos mais de um milhão de espécies de animais ao longo dos tempos, muitos ainda são ignorados. Os mais conhecidos são os vertebrados, no entanto estes representam apenas 5% dos existentes, os restantes 95% são desprovidos de esqueleto interno, animais que diferem entre si pelo tamanho, estrutura e outras características (Silva et al., 2002).

O meio aquático é riquíssimo em espécies, principalmente invertebradas, com bastante interesse no campo das biotecnologias (os espécimes do Filo Cnidária, estão agrupados em aproximadamente 10.000 espécies diferentes, tais como os corais, as medusas e as hidras).

Os cnidários ocupam vastas áreas nos ecossistemas marinhos, assim na sua preservação importa conhecer não só a sua ecologia, mas também os padrões que regulam as suas populações. Este entendimento serve de base para que estudos de crescimento, colonização e povoamento permitam alcançar um equilíbrio sustentável do ambiente (Gadelha, 2007).

A procura dos corais tem vindo a diminuir nos últimos anos, quer por parte de colecionadores de espécies marinhas, quer da indústria (produção de cal e materiais de construção), pois anteriormente terem levado à destruição total de recifes, com a extracção anual de milhares de toneladas de corais (Delbeek, 2001).

Assim, o estudo destes espécimes tem sido objecto de interesse, na forma como actuar na sua conservação, mantendo-se a biodiversidade e produção de biomassa em quantidade, de forma rápida e menos onerosa. Ao encontrar este método, torna-se possível utilizar maior volume de biomassa de corais nas indústrias (incluindo a farmacêutica), sem que para isso, se prejudique os recifes, podendo ainda realizar-se o repovoamento de alguns destes habitats, com corais produzidos em cativeiro.

Dentro do contexto e com o objectivo de aumentar o conhecimento sobre a biotecnologia dos *Discosoma* sp., realizámos um estudo teórico-prático, cujas dimensões se apresentam inter-relacionadas.

No campo teórico, a pesquisa bibliográfica, conta com uma breve descrição da espécie *Discosoma* sp., da fotobiologia dos corais e das suas utilizações comerciais.

No campo prático, propõe-se um acompanhamento *de Discosoma* sp., com o objectivo de identificar regimes luminosos a que estes melhor se adaptam. Para tal, testou-se o efeito na sua fotobiologia de diferentes cores de iluminação LED, através de medições efectuadas com espectrorradiómetro e fluorómetro.

II. Pesquisa Bibliográfica

1. Discosoma sp.

O Filo Cnidário ou Coelenterata, tem uma das mais longas histórias entre os fósseis de metazoários, onde datam do pré-câmbrico, entre 700 e 600 milhões de anos atrás, estando a origem dos cnidários directamente relacionada com a origem dos metazoários (Brusca & Brusca, 1990).

Os animais da espécie *Discosoma* sp. encontram-se, geralmente, na base trófica dos ecossistemas dos recifes de coral, apresentando-se em diferentes formas, padrões e cores. Estas diferem desde do azul ao castanho, passando pelo verde e vermelho (Gadelha, 2007; Pakoa & Pickering, 2001).

São designados vulgarmente por “coral-cogumelo”, em inglês denominados por “mushrooms corals”, ou também, geralmente identificados como “falso coral”, “anémone coral” ou “anémone cogumelo” (Pakoa & Pickering, 2001; Sprung, 2002).

1.1. Taxonomia

O filo Cnidário encontra-se dividido em classes de organismos, tais como, os Anthozoa, Hidrozoa e Sciphozoa. Neste filo, é possível ver algumas das espécies mais belas da natureza, contudo, bastante estranhas (Storer *et al.*, 1965).

A taxonomia destes seres é ainda pouco clara, uma vez que as características morfológicas se diferenciam bastante entre géneros. De acordo com a seguinte organização taxonómica (Pakoa & Pickering, 2001), *Discosoma* sp. é classificado do seguinte modo:

Filo: Cnidária

Classe: Anthozoa

Subclasse: Hexacoralia

Ordem: Corallimorpharia (Carlgren, 1940)

Família: Discosomatidae (Duchassaing and Michelotti, 1864)

Género: *Discosoma* sp. (Ruppel and Leuckart, 1828)

Os espécimes da ordem Corallimorpharia são, tal como sugere o nome, muito semelhantes aos corais, mas não têm esqueleto (Sprung, 2002).

Nesta ordem, encontram-se os corais conhecidos pela sua forma de cogumelo, pertencentes ao género *Discosoma* sp., que são populares por terem uma grande variedade de cores (Pakoa & Pickering, 2001). Estes indivíduos de corpo mole apesar de se assemelharem a anémonas, são morfologicamente e filogeneticamente mais próximos dos corais que possuem esqueleto calcário (Miles, 1991).

1.2. Anatomia

Os cnidários são metazoários diplobásticos (Beaumont & Cassier, 1978), com estrutura corporal relativamente simples, de forma cilíndrica (parecendo um saco), sem conter um sistema de órgãos e apresentando simetria radiada. Estas características estão directamente relacionadas ao aparecimento do sub-reino Metazoa (Brusca & Brusca, 1990; Storer *et al.*, 1965). A simetria radial, de ordem par (4 ou 6) é uma característica que está presente tanto nos indivíduos adultos, como em larvas de cnidários (Brusca & Brusca, 1990). A cavidade digestiva tem a forma de saco, por vezes com ramificações. A sua parede rodeia a cavidade gastrovascular, comunicando com o exterior por uma abertura, que funciona ao mesmo tempo como boca e ânus. Os cnidários foram os primeiros organismos com um sistema neuromuscular (Storer *et al.*, 1965).

A principal divergência da classe Anthozoa em relação aos restantes cnidários sucede quando estes perdem a forma de medusa, encontrando-se apenas na forma de pólipos ao desenvolverem simetria hexaradial ou octaradial e ao fixarem-se ao substrato através do disco basal ou pé (Brusca & Brusca, 1990; Beaumont & Cassier, 1978).

Apesar das semelhanças anatómicas e funcionais com anémonas, os elementos pertencentes ao género *Discosoma* sp. são corais moles, geralmente macios e flexíveis, desprovidos de esqueleto carbonatado, nem interno nem externo e os tentáculos dispostos radialmente são de reduzido tamanho e, praticamente inexistentes (pseudo tentáculos), podendo ser observados como pequenas protuberâncias existentes no disco oral. O seu sistema nervoso é simples e liga a boca aos tentáculos (Miles, 1991; Pakoa & Pickering, 2001; Sprung, 2002).

Estes corais são constituídos basicamente por um disco bucal achatado (perístoma) (Miles, 1991; Storer *et al.*, 1965), uma base ou disco peduncular, que lhes permite a fixação ao substrato e, um corpo cilíndrico liso e flexível com a inexistência de órgãos diferenciados (Pakoa & Pickering, 2001). O disco bucal pode ser liso ou com nervuras e a sua bordadura pode formar lóbulos pontiagudos ou serem uniformemente circulares. Neste, situa-se a boca centralizada, que comunica com a cavidade gástrica através de uma faringe com simetria bilateral, dividindo-se em 8 ou mais septos, também conhecidos por mesentérios, através de umas pregas longitudinais (Brusca & Brusca, 1990; Beaumont & Cassier, 1978).

Na epiderme destes animais encontram-se os cnidócitos que, por sua vez, dão origem ao nome do filo Cnidária. O cnidócito (Fig. 1) é constituído por uma cápsula, o

nematocisto, onde está enrolado o filamento urticante e um cnidocílio. A membrana envolvente do cnidócito é designada por cnidoblasto (Beaumont & Cassier, 1978; Pechenik, 1996). Entre a epiderme e a gastroderme, encontra-se a mesogleia, que ao

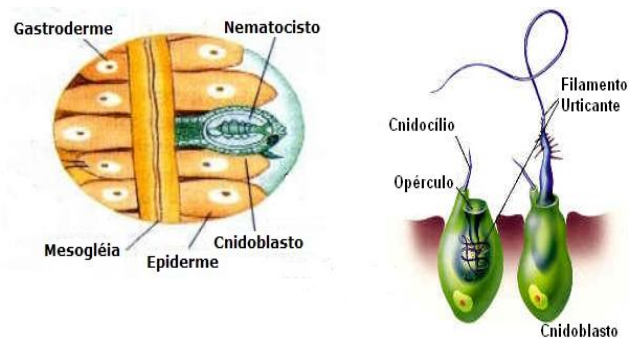


Fig.1: Esquema de cnidócito

(Fonte: Adaptada de Portal São Francisco, 2002)

contrário do que acontece nos Metazoários superiores (mesoderme) não é considerada como uma camada germinativa especial, nem participa na formação da musculatura (Hadorn & Wehner, 1978). A consistência dos seus tecidos é espessa e, devido à produção de muco, são escorregadios (Sprung, 2002)

Vivem vulgarmente solitários, podendo atingir tamanhos até 25 cm de diâmetro de disco oral, enquanto os que vivem em colónias não ultrapassam o tamanho de 1 a 3 cm de diâmetro. O crescimento dos corais e dos recifes de coral depende de factores, tal como a intensidade de luz, temperatura da água, salinidade, turvação, disponibilidade de alimento e espaço para crescerem. Desde que estes requisitos sejam satisfeitos, as colónias de corais, geralmente, crescem até 10 cm/ano.

1.3. Reprodução

O ciclo de vida da maioria dos cnidários apresenta duas formas de reprodução, sexuada e assexuada (Fig. 2). Na primeira, existe a diferenciação das gónadas e com o posterior lançamento dos produtos sexuais (espermatozóides e óvulos) na água, através da boca, resultam larvas pelágicas (plânulas). O lançamento dos produtos sexuais é também conhecido por desova, que em alguns recifes de coral ocorre em massa durante algumas noites do ano, entre Outubro e o início de Dezembro (Castro & Huber, 2008). As plânulas têm uma forma oval, apresentando simetria bilateral e completamente ciliadas.

Algumas espécies de corais têm sexos separados, mas cerca de 75% são hermafroditas.

A reprodução assexuada ocorre quando os pólipos formam pequenas réplicas (clones) (Beaumont & Cassier, 1978; Silva et al., 2002). Os pólipos formam gomos que dão origem a novos pólipos, que ao permanecerem em ligação ao pólipo materno e, em condições favoráveis, desenvolvem colónias constituídas por numerosos indivíduos (Hadord & Wehner, 1978).

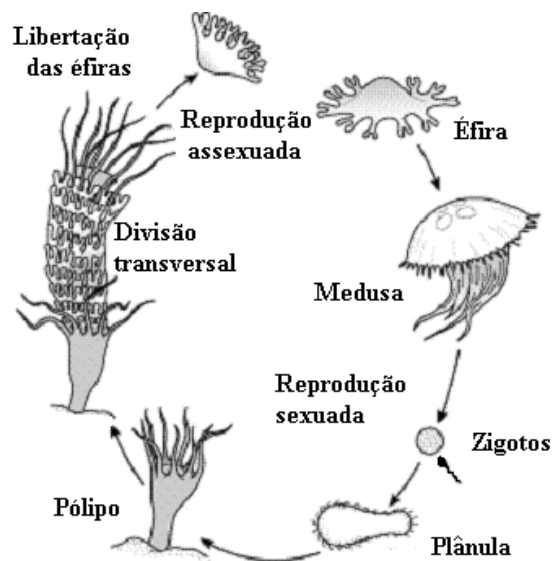


Fig.2: Exemplo de ciclo de vida de um Cnidário – Classe Scyphozoa (Fonte: Pechenik, 1996)

A reprodução assexuada, proveniente da fragmentação artificial de corais, neste momento é um factor importante para a recuperação de recifes de coral danificados por perturbações, tais como tempestades, podendo-se restaurar recifes através do transporte para uma nova zona (Castro & Huber, 2008).

Nos indivíduos da espécie *Discosoma* sp., em que os sexos estão separados, geralmente, a fecundação ocorre na cavidade gástrica das fêmeas, onde ficam a incubar os ovos. Após o período de incubação o zigoto dá origem a uma plânula, deixando a cavidade gástrica, fixando-se de novo no substrato (Boué & Chanton, 1974). Apesar de os *Discosoma* sp. poderem realizar reprodução sexuada, tem sido evidente que o principal modo de reprodução destes e de todos os cnidários é a assexuada ou

vegetativa, sendo possível observar diferentes formas, tais como, a laceração do pé, gemulação e/ou divisão longitudinal ou transversal (esta menos usual) (Boué & Chanton, 1974; Miles, 1991; Sprung, 2002).

1.4. Habitat

Estudos arqueológicos encontram fósseis de coral em espaços pouco vulgares, o que permite subentender que, no passado, a rocha se encontrava em ambientes tropicais com baixas profundidades, ou o clima desse mesmo espaço era ambientalmente mais propício ao desenvolvimento de recifes de corais.

Os organismos do filo Cnidária são essencialmente aquáticos (99%), alguns de água doce, mas a maioria de águas marinhas. Encontram-se, geralmente, fixos em substrato (conchas ou rochas) formando colônias, enquanto outros têm vida livre (Beaumont & Cassier, 1978; Silva et al., 2002). Muitos deles ocorrem nas duas formas, em pólipos e em medusa, consoante a fase do ciclo de vida em que se encontram (Hadord & Wehner, 1978).

É possível visualizar indivíduos do filo Cnidária desde a costa até profundidades de aproximadamente dos 10 mil metros. Estes surgem por todo o mundo, desde os trópicos até aos pólos (Pechenik, 1996; Storer, et al., 1965). Contudo, estes indivíduos são abundantes (Fig. 3) ao largo da Florida, Havai, Filipinas, Austrália e África Oriental (Pakoa & Pickering, 2001).

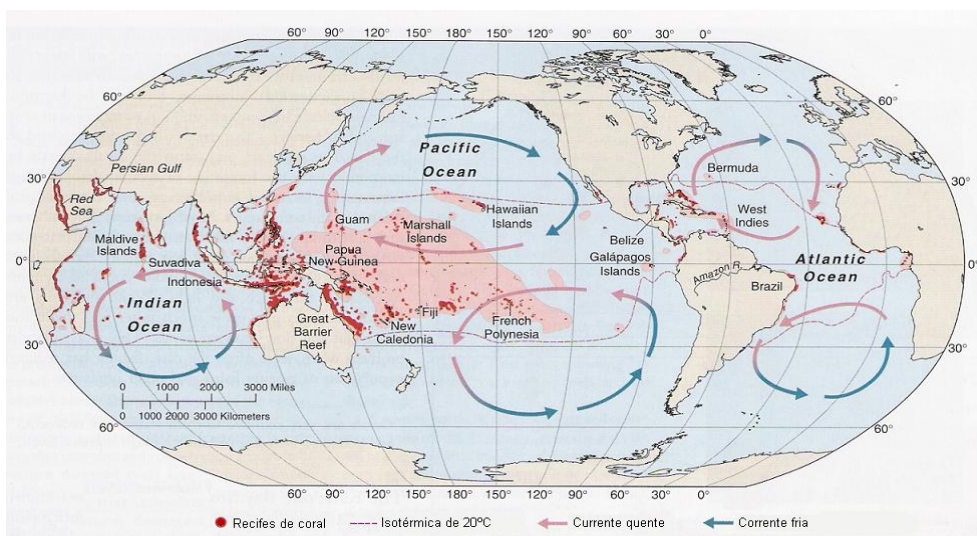


Fig. 3: Distribuição das comunidades de recifes de coral
(Fonte: adaptado de Castro & Huber, 2008)

O desenvolvimento de corais com endosimbiontes fotossintéticos é mais propício em águas costeiras tropicais ou subtropicais, encontrando-os nas plataformas continentais ou ao redor de ilhas, onde exista algum tipo de superfície dura (Castro & Huber, 2008), necessitando de espaço no substrato para se estabelecerem e crescerem (Miles, 1991).

Os Coralimorfos ao encontrarem-se apenas no estado de pólipo, têm necessidades muito particulares em relação à temperatura e luminosidade, mas também à salinidade e poluição aquática (Castro & Huber, 2008). Nestas condições favoráveis, são bastante produtivos e com grande biodiversidade (Barnes, 1987). Os indivíduos da espécie *Discosoma* sp. existem em zonas com pouca profundidade (inferior a 30 metros), dos oceanos Atlântico Ocidental, Índico e Pacífico, em águas límpidas e pobres em nutrientes. A preferência pelas baixas profundidades ocorre, devido à necessidade da manutenção dos seus endosimbiontes (zooxantela), uma vez que, está relacionada com o fornecimento de luz suficiente para a fotossíntese. Contudo, parecem preferir baixos níveis de luz ou luz indirecta. Em cativeiro, iluminação forte, pode levar à perda de pigmento dos corais por libertação das zooxantelas, como também causar-lhes a curvatura do disco oral (Sprung, 2002).

Os corais, para que possam crescer e desenvolver colónias necessitam que a água tenha uma temperatura média superior aos 20°C. Porém, se a água estiver a uma temperatura superior (30-35°C), causará stress, o que leva ao branqueamento do coral, pois este expelle as zooxantelas simbióticas, por exemplo quando expostos a marés baixas muito prolongadas, uma vez que o sol pode aquecer a água até temperaturas extremas (Castro & Huber, 2008)

Os *Discosoma* sp., tal como a maioria dos corais, são sensíveis a salinidades reduzidas, cujos valores se aproximem de 32 e o pH da água entre os 8,1 e os 8,4 (Castro & Huber, 2008; Thiel, 1997). Estes corais apresentam grande resistência, sendo a qualidade da água e iluminação mais prejudiciais a estes, do que doenças ou mesmo predadores (Thiel, 1997).

Contudo, os recifes de coral encontram-se ameaçados, devido ao aumento constante de CO₂ atmosférico, que tem levado ao aumento da temperatura e descida do pH da água do mar (Kleypas et al., 2006; Kuguru et al., 2008). Estas alterações têm

impactos negativos nos seres marinhos calcificadores e nos ciclos naturais dos Oceanos. Dado que, a redução de CaCO_3 afecta a capacidade dos corais reconstruírem os recifes, após erosão (Kleypas et al., 2006)

1.5. Nutrição

Os cnidários são conhecidos por conterem cnidócitos, que são células urticantes altamente especializadas na defesa e captura de alimento. Um animal ao entrar em contacto com o cnidócito provoca a libertação de um filamento urticante que se enrola no corpo da vítima, injectando-lhe veneno paralisante (Beaumont & Cassier, 1978; Hadorn & Wehner, 1978; Silva et al., 2002). Posteriormente, a vítima é transportada até à boca através dos tentáculos, introduzindo-a na cavidade gástrica, iniciando-se a digestão por acção de enzimas, produzidas por células secretoras da gastroderme. Os produtos da digestão difundem-se seguidamente para as outras células do organismo, enquanto o que não é digerido é eliminado através da boca (Silva et al., 2002).

A alimentação é predominantemente carnívora, alimentam-se de zooplâncton, de partículas em suspensão na água e mesmo de pequenos peixes. Algumas presas são agarradas directamente pela boca dos cnidários, podendo estes aumentar de volume, devido ao tamanho da presa. Têm ainda a capacidade de soltar os filamentos através da boca, podendo assim absorver alimentos e matéria orgânica dissolvida na água fora do corpo (Castro & Huber, 2008; Storer et al, 1965).

Os espécimes de *Discosoma* sp., durante toda a vida, têm predominantemente uma alimentação à base de produtos obtidos através da fotossíntese, realizada pelas zooxantelas simbióticas, completando esta com alimentos orgânicos dissolvidos na água e partículas aprisionadas no muco que segregam (Sprung, 2002; Takahashi et al., 2009).

2. Fotobiologia dos corais

O sol serve como principal fonte de energia para o funcionamento para a maioria dos ecossistemas terrestres e aquáticos, que produzem matéria orgânica através da fotossíntese. A fotobiologia é a interação que existe entre a luz visível e radiação ultravioleta com os seres vivos, radiação que torna possível a vida, mas pode ser prejudicial em algumas circunstâncias, especialmente a fracção da radiação ultravioleta (280-400 nm) aos organismos fotossintetizadores (Smith, 2004).

No final do século XIX foram observadas pela primeira vez algas fotossintéticas dentro de tecidos de animais aquáticos, que levavam estes a comportarem-se como plantas, uma vez que para beneficiarem da fotossíntese necessitavam de se expôr à luz solar (Furla et al., 2005).

As algas simbióticas que ocupam maior destaque em espécies marinhas são os dinoflagelados (Fig. 4) do género *Symbiodinium* sp. (normalmente designados por zooxantelas), encontrando-se em praticamente em toda a zona trófica do recife de coral (Venn et al., 2008; Yellowlees et al., 2008). A simbiose com hospedeiros animais pode ocorrer em diversos grupos de invertebrados marinhos, principalmente no filo Polifera (esponjas) e Cnidaria (anémonas e corais). Os corais podem conter mais do que uma das 16 espécie existentes de *Symbiodinium*, o que lhes confere alguma flexibilidade na ocorrência de mudanças ambientais, tais como gerarem um padrão distinto de zooxantelas quando situadas em diferentes profundidades do recife de coral ou mesmo

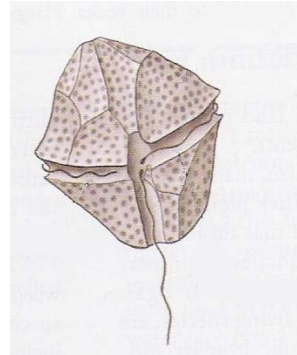


Fig.4: Esquema de um dinoflagelado

(Fonte: adaptado de Castro & Huber, 2008)

quando localizados em diferentes zonas geográficas (Abrego et al., 2008; Hennege et al., 2009). Mesmo após eventos de stress que promovam a disrupção da simbiose, os endossimbiontes expulsos podem re-infectar o mesmo ou um novo hospedeiro, continuando fotoquimicamente funcionais (Soffer et al., 2008; Yellowlees et al., 2008).

Estas algas unicelulares com capacidade de se movimentar, são seres vivos autotróficos, produzindo lípidos e amido, como produtos de reserva.

As zooxantelas contêm uma combinação de pigmentos, entre eles a clorofila (*a* e *c*) e carotenos. Para otimizarem a simbiose, necessitam de se foto-aclimatizar, captando e utilizando a luz solar com mais eficiência. A luz é, muitas vezes, o recurso que os recifes de corais têm para conseguirem sobreviver em águas pobres em nutrientes. Portanto, a otimização da fotossíntese é crucial para que exista estabilidade da simbiose e, por sua vez, contribuir para a manutenção dos cnidários e criar recifes inteiros, com a formação de esqueletos de alguns corais (Hennege et al., 2009).

Os corais são completamente dependentes das zooxantelas, usufruindo da fotossíntese devido a associações simbióticas/mutualistas. Estas encontram-se hospedadas na membrana simbiosomal (endoderme) (Venn et al., 2008; Barnes, 1987; Gomes & Schaff, 2008; Soffer et al., 2008). A forma da interação simbiótica das algas com os corais ocorre relativamente cedo no seu ciclo de vida, o que lhes permite ter alguma autonomia para crescerem em águas pobres em nutrientes (Gomes & Schaff, 2008). A morfologia simples do coral e o volume corporal são adequados para a captação de luz, através das algas simbióticas (Venn et al., 2008; Rudman, 2000).

O coral proporciona aos endosimbiontes um ambiente seguro e protegido, onde se podem propagar através de reprodução assexuada, fornecendo-lhes compostos, tais como nitrogénio e dióxido de carbono que são subprodutos do metabolismo do coral, mas fundamentais para que as zooxantelas realizem a fotossíntese. Em contrapartida, as algas em simbiose, produzem oxigénio e servem de colector de resíduos metabólicos dos animais, transformando-os em aminoácidos essenciais, glicose e outros glícidos, que são posteriormente libertados para o hospedeiro (Barnes, 1987; Levinton, 1995).

O processo de fotossíntese, segundo os autores Castro & Huber, (2008) pode ser descrito como:



Após a utilização da matéria orgânica, o hospedeiro liberta compostos inorgânicos que, por sua vez, sustentam o processo fotossintético (Hennege et al.,

2009). Aproximadamente 90% do material orgânico produzido através da fotossíntese é transferido para o tecido corporal dos hospedeiros (Sumich, 1996).

A fotossíntese pode apresentar riscos para alguns animais, devido ao aumento da radiação, originando danos nas membranas simbiosomais que, por sua vez, leva ao colapso da simbiose. Este processo culmina na expulsão dos endossimbiontes, sendo conhecido por branqueamento do coral (Venn et al., 2008).

A simbiose ocorre principalmente quando os sistemas marinhos são pouco ricos em nutrientes (Gomes & Schaff, 2008). Daí tornar-se essencial que exista um equilíbrio qualitativo do meio aquático onde estão inseridos (meio natural ou em cativeiro), para que se possam satisfazer as condições ótimas para o desenvolvimento de ambos os membros da simbiose.

Alterações anormais dos parâmetros ambientais, tais como exposição à maré baixa, infecções, elevados índices de radiação ultravioleta e elevada temperatura da água do mar podem provocar, em algumas situações, a libertação da zooxantela dos hospedeiros, devido a entrarem em stress fisiológico. Sendo estas zooxantelas responsáveis pela diversidade de cores existentes nos corais, ao ocorrer a libertação, estes ficam com uma aparência totalmente branca, geralmente descrito como branqueamento dos recifes de coral. Ao ocorrer por longo período de tempo, poderá resultar na morte dos corais (Barnes, 1987).

Um dos parâmetros que se utiliza para o estudo da saúde de corais marinhos é a concentração das zooxantelas (quantidade de endossimbiontes por centímetro quadrado de superfície do coral). Para tal, é necessário recolher do coral um fragmento, o que só por si, é uma técnica invasiva geradora de stress.

3. Utilizações comerciais dos corais

Os recifes de coral têm grande importância na protecção e defesa das zonas costeiras, contra tempestades tropicais. Têm ainda um papel importante em determinadas economias, principalmente de países e ilhas das zonas tropicais do Pacífico. A subsistência destas populações está relacionada com o comércio de corais (curiosidade marinha e decoração), servem igualmente de suporte a uma pesca artesanal de peixes costeiros, crustáceos e moluscos, fomentam o turismo, atraindo milhares de mergulhadores e turistas, anualmente (Pakoa & Pickering, 2001).

Existem evidências de que os corais e outros habitantes dos recifes fornecem compostos importantes à indústria farmacêutica, concretamente no tratamento do cancro, analgésicos e anti-inflamatórios

Actualmente, o valor económico e ecológico dos corais, tem sustentado o interesse de uma maior procura destes na área da investigação (Pakoa & Pickering, 2001), existindo trabalhos desenvolvidos na propagação de corais para demonstrações científicas. Essa propagação é feita através de culturas *in-situ*, nos países do 3.º mundo como, por exemplo, as Filipinas, Ilhas Fiji e Japão (utilizando métodos menos invasivos ao ambiente) ou *ex-situ* como a Europa e os EUA (Delbeek, 2001).

3.1. Aquariorfilia

A procura comercial de corais, como curiosidade marinha e decoração, teve início nos anos 70, havendo um aumento drástico da colheita dos corais nos anos 80, para serem comercializados na Europa e EUA, provenientes principalmente das Filipinas e Indonésia. O comércio destes, durante os anos 80, aumentou em média 20 toneladas por ano, já em 1995 foram capturadas mais de 400 toneladas. Devido a factores, tais como o excesso de colheita de corais, a poluição das águas e as mudanças climáticas, levaram à criação de políticas anti-extermínio dos recifes de coral. Elas fomentam o cultivo de corais, em particular de corais duros, usados para a reabilitação de recifes degradados e no comércio ligado à aquariorfilia (Delbeek, 2001).

Assim a comercialização de corais tem vindo a aumentar, apesar do alto custo dos equipamentos e animais e a necessidade de obrigar a alguns conhecimentos e dedicação. Os aquários públicos, na actualidade, têm a responsabilidade de educar o público e demonstrar como se tratam os corais vivos, com o objectivo da conservação e propagação dos corais existentes. Na Europa, o *Aquário do Mónaco* propaga corais com a finalidade de realizar investigação (Delbeek, 2001; Pakoa & Pickering, 2001).

Apesar do aumento da propagação de corais em cativeiro é evidente que esta indústria ainda está numa fase inicial, uma vez que, para tal, são necessários conhecimentos sobre os requisitos mínimos na manutenção das diferentes espécies de corais (Delbeek, 2001). Juntamente com um investimento elevado em material, desde o aquário e seus acessórios, alimentação e os próprios organismos vivos, é ainda da máxima importância, recriar um ambiente o mais parecido com o natural, para conseguir manter ou mesmo produzir as espécies em cativeiro (Alves, 2009).

É necessário que se cumpram os requisitos mínimos dos parâmetros físico-químicos da água onde são mantidos, tais como a temperatura, salinidade e pH. Deve evitar-se mudanças repentinas dos parâmetros físico-químicos da água onde se encontram os corais, principalmente quando estes são colhidos do meio selvagem e estabelecidos em cativeiro, pois ao provocar-lhes stress fisiológico, estes retraem-se, ficando com aspecto pouco túrgido e mais susceptíveis ao aparecimento de parasitas (Pakoa & Pickering, 2002; Thiel, 1997). Contudo, a capacidade que os *Discosoma* sp. têm para viver em águas relativamente pobres em qualidade e a sua fácil manutenção, torna-os um tipo de coral apreciado pelos simpatizantes da aquariofilia marinha (Pakoa & Pickering, 2002).

Os produtores de corais, com o aumento do conhecimento, têm vindo a utilizar técnicas de propagação das colónias-mãe, tais como a fragmentação que, por sua vez, é um método simples, conseguindo obter milhares de fragmentos por ano. Fragmentos esses que podem demorar 2 a 5 anos até obterem tamanho para serem economicamente viáveis. No entanto, para alguns géneros de corais, como o *Acropora* sp., que ao fragmentar ficam um pouco pálidos, será preferível recorrer à reprodução sexuada, dando origem a centenas de novas colónias. Nesta técnica podem capturar-se os ovos aquando da desova do coral, ou então, levar para o laboratório colónias maduras e

provocar-lhe a desova, conduzindo-as novamente para o recife. Através destas técnicas obtém-se um grande número de descendentes, reduzindo a necessidade de capturar espécies selvagens para abastecer o mercado (Delbeek, 2001).

Os *Discosoma* sp. são uma espécie de coral muito popular na aquariofilia, uma vez que são robustos, fáceis de manter em condições artificiais e porque possuem grande variedade de cores e formas, o que confere uma beleza inigualável aos aquários (Sprung, 2002).

3.2. Biotecnologia

Os oceanos são uma fonte de produtos naturais únicos, concentrados em diversos seres vivos. Parte destes produtos apresentam propriedades cosméticas e farmacológicas, sendo instrumentos para o desenvolvimento de compostos bioactivos, no combate de doenças, como por exemplo, o cancro, ou mesmo para a descoberta de novos analgésicos e anti-inflamatórios (Kumar Jha & Zi-Rong, 2004; Pallela et al., 2010).

O mergulho com fins científicos permitiu a realização de pesquisas em produtos marinhos, considerando os oceanos como um novo recurso na obtenção de compostos químicos. Têm sido publicados alguns dados sobre a síntese e caracterização bioquímica e farmacológica desses produtos (Carte, 1996)

A vida marinha é rica em biodiversidade genética e com potencial para aplicações biotecnológicas, relacionadas com a descoberta de novos medicamentos e desenvolvimento de recursos e processos industriais, obtidos de compostos bioquímicos produzidos por invertebrados marinhos, algas e bactérias. Estes apresentam grande potencial para novos medicamentos (Kumar Jha & Zi-Rong, 2004; Fattorusso & Tagliatela-Scafati, 2009). O desenvolvimento clínico de novos agentes terapêuticos, com produtos naturais marinhos, demonstra um amplo espectro da actividade farmacológica que, provavelmente, resultará em novos agentes terapêuticos, para tratamento de várias doenças (Fattorusso & Tagliatela-Scafati, 2009; Mayer et al., 2009).

Geralmente os invertebrados marinhos, são uma fonte promissora para novos medicamentos pois, encontram-se em simbiose com microrganismos, como bactérias, cianobactérias, fungos e microalgas. De salientar ainda, que estes simbiotes, podem ser encontrados em concentrações superiores às da água do mar, desempenhando um papel importante na biossíntese de produtos naturais (Fattorusso & Taglialatela-Scafati, 2009; Mayer et al., 2009).

Os cnidários representam uma fonte rica em venenos e toxinas, podendo estes conter um conjunto de substâncias úteis à farmacologia, tais como péptidos, fosfolípidos, glicoproteínas e aminas bioactivas (Messerli & Greenberg, 2006).

O interesse pelos corais tem vindo a aumentar não só no sector comercial, mas também na indústria química, com a produção de moléculas bioactivas utilizadas na farmacologia, permitindo destacar a aquariofilia nas distintas áreas da aquacultura (Gadelha, 2007). Na grande maioria dos corais (duros e moles) têm sido demonstradas propriedades: anti-bacteriana, anti-malária, anti-tuberculose e anti-inflamatória (Mayer et al., 2009). São também potenciais agentes fotoprotectores e anti-fotoenvelhecimento, protegendo a pele humana de danos, causados por radiações ultra violeta (UV) (Pallela et al., 2010). Também têm servido como substituto ósseo no tratamento de problemas de ortopedia nos seres humanos, tais como no preenchimento de falhas ósseas, ou na substituição de osso devido a tumores. São ainda considerados em cirurgia plástica, na reconstrução facial. O esqueleto calcário possui boas propriedades para ser utilizado como excertos ósseos, uma vez que não requer a remoção da matriz óssea do paciente, permitindo implantes ósseos de longa durabilidade que se assemelha à do osso natural (Demers et al., 2002).

III. Material e Métodos

O trabalho prático para a elaboração da tese de Mestrado decorreu nas instalações do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

1. Obtenção e propagação do material biológico

Os indivíduos utilizados no ensaio pertenciam a uma população mono clonal de *Discosoma* sp. (coral-cogumelo) de pigmentação vermelha da colecção de invertebrados marinhos do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar – Universidade de Aveiro. A utilização de indivíduos geneticamente iguais assegura-nos, desta forma, que a única fonte de variabilidade existente no ensaio seria a variável experimental em causa (iluminação) e não a variabilidade genética dos organismos.

Foram necessários 20 indivíduos para todo o ensaio, mas devido à limitação do material biológico, recorreu-se ao método de propagação assexuada, com a fragmentação de 8 indivíduos. Esta técnica consiste em realizar um corte longitudinal no indivíduo, seccionando-lhe o centro da abertura que serve de boca/ânus até ao pé do coral, separando-o em duas partes iguais (Fig. 5).

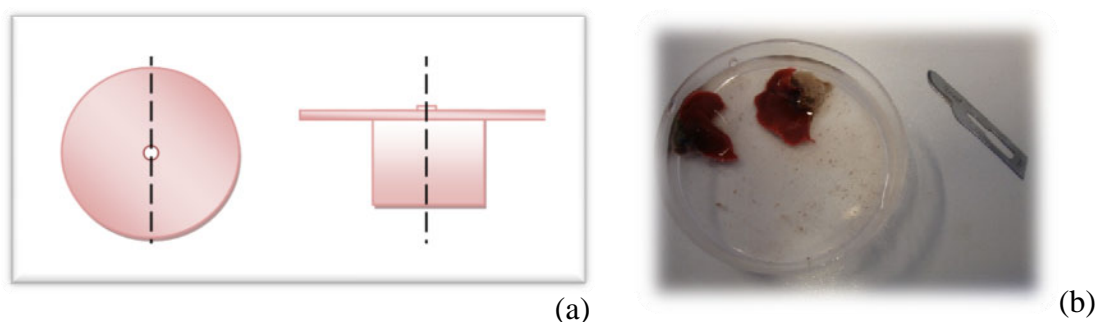


Fig. 5: (a) Ilustração do corte longitudinal (vista sagital; vista frontal); (b) fotografia do corte em laboratório.

Após a realização da fragmentação dos 8 indivíduos, colocaram-se as 16 metades de coral-cogumelo no tanque iluminado com LED's de luz 100% branca,

enquanto os 4 indivíduos que não foram propagados, foram colocados no tanque da colónia mãe, iluminado com luz HQI. O processo de regeneração da totalidade do disco oral durou aproximadamente 15 dias, ou seja, este processo está completo quando o disco oral se encontra completamente fechado, tal como a cavidade digestiva.

2. Manutenção em laboratório

No acompanhamento dos corais-cogumelo, mantidos em condições *ex-situ*, foi necessário recriar o ambiente natural onde estes vivem, simulando o factor iluminação, tal como as restantes condições ambientais (temperatura, pH e salinidade da água), ideais à espécie.

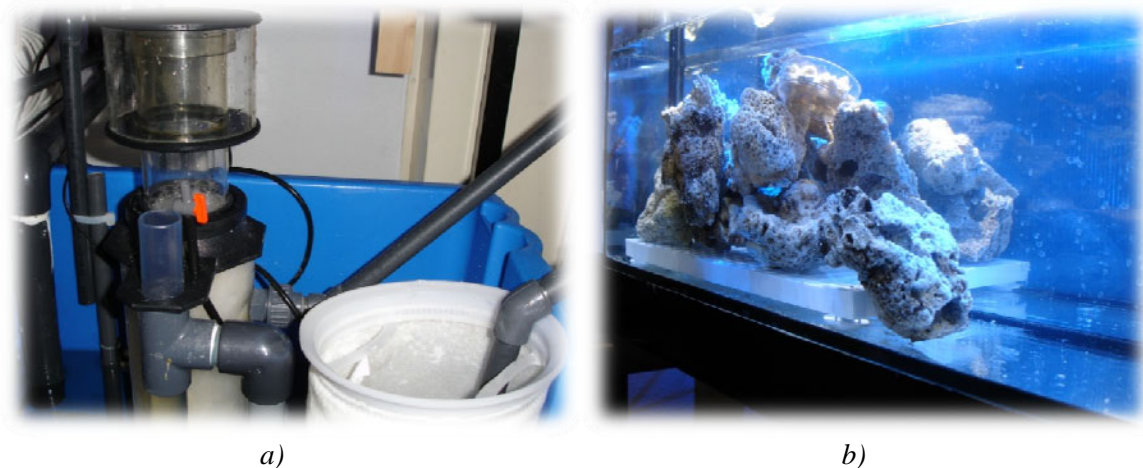
Para tal, foi necessário recorrer à montagem de um sistema de suporte de vida, nas instalações da Universidade de Aveiro. O sistema era composto por 8 aquários em vidro (posteriormente denominados por tanques), dispostos em paralelo, com volume de $0,016\text{m}^3/\text{tanque}$ ($0,20 \times 0,16 \times 0,50$ m), ligados a um tanque “reservatório” (sump), para recepção de água, com volume de $0,077\text{ m}^3$ (Fig. 6), através de tubagens e válvulas de PVC (Policloreto de Vinil).



Fig. 6: sistema de suporte de vida (desactivado).

O sistema foi montado em circuito fechado, recorrendo-se ao auxílio de uma bomba de água (Eheim; 1262 - 3400 l/hora), instalada no sump, de modo a proporcionar a circulação e a reutilização da água, com um caudal de 150 l/hora/tanque.

Com o objectivo de manter as características biológicas e químicas da água, recorreremos à montagem de sistemas de filtração mecânica e mecânico-química na “sump”. A filtração mecânica, efectuada com um filtro de saco em poliéster, é utilizada para reter partículas de dimensão superior a 100 µm, através da passagem da água vinda dos tanques. Paralelamente utilizou-se a filtração mecânico-química, feita com um escumador de proteínas (Deltec; APF 600) (Fig. 7a), também conhecida na terminologia inglesa por “protein skimmer”, com a finalidade de baixar a carga de detritos orgânicos do sistema, provenientes de excreções e partículas em suspensão. O seu funcionamento baseia-se em injectar ar do exterior na água dentro do escumador, maximizando o tempo de contacto entre as micro-bolhas de ar e a água, o que promove a formação de “espuma” que ao ser libertada no “copo” do escumador ajuda na remoção dos compostos orgânicos da água do tanque. De forma a garantir a optimização da filtração biológica, utilizou-se rocha viva (Fig. 7b) de recife de coral, com alta porosidade, colocada em dois dos tanques montados para esse fim, permitindo assim o desenvolvimento de bactérias aeróbias nitrificantes na região mais externa da rocha e anaeróbias desnitrificantes na região mais interna.



*Fig. 7: a) Escumador e filtro de 100 micra (sentido esquerda/direita);
b) Tanques com rocha viva*

Na sump, encontra-se também, uma resistência eléctrica (Eheim; 300w) submersa com termóstato, utilizada como fonte de calor, para manter a água do sistema

a uma temperatura de 25,5°C (+/- 1°C), pois segundo os autores Takahashi et al. (2009) esta é adequada à manutenção de *Discosoma* sp..

No sistema de iluminação, recorremos à utilização de calhas de iluminação LED (Light Emitting Diode) de diferentes cores: 100% azul (AQUARAY; Reef Blue), 100% branca (AQUARAY; Marine White) e 67% azul + 33% branca (AQUARAY; Marine Blue), (Fig. 8). Os sistemas de iluminação encontram-se independentes e foram utilizados de modo a que cada calha, iluminasse apenas um tanque, aplicando entre cada um deles, uma placa opaca, para que a luz de cada tanque não influenciasse os outros ensaios. As calhas foram montadas aproximadamente a 6 cm da superfície da água e 20 cm da base do tanque, onde se colocaram os indivíduos *Discosoma* sp.. A altura foi determinada/ajustada pelo efeito de homogeneização da luz no tanque. O sistema de iluminação encontrava-se ligado a um relógio/temporizador que assegurasse um fotoperíodo de 12/12 h luz/escuro.

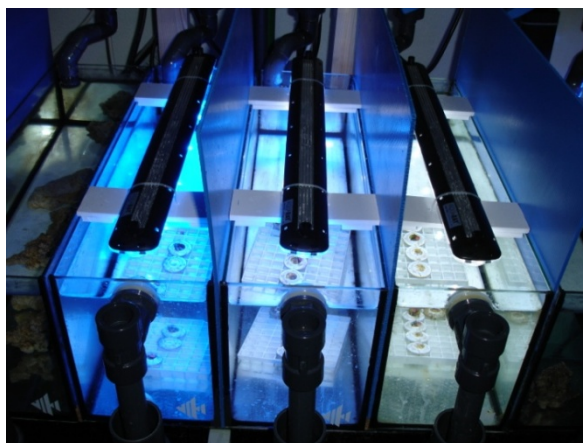


Fig. 8 - Tanques com sistema de iluminação LED. Da esquerda para direita: Iluminação 100% azul; 67% azul com 33% branca (Mista); 100% branca.

Para garantir um correcto funcionamento do sistema de suporte de vida foi necessário cumprir com alguns procedimentos, tais como, realizar medições regulares dos parâmetros físico-químicos da água e limpeza dos tanques e equipamentos do sistema. Diariamente, realizou-se medições da salinidade, do pH e da temperatura, com o refractómetro, caneta medidora de pH (Hanna Instruments) e termómetro, respectivamente, podendo controlar com maior exactidão alterações destes parâmetros.

A medição das concentrações de cálcio (Ca), nitratos (NO₃), fosfatos (PO₄) e dureza carbonatada (KH), foram realizadas semanalmente, utilizando os testes colorimétricos da marca Salifert (Fig. 9). Os parâmetros medidos, foram mantidos nos valores padrão indicados na tabela I.



Fig. 9: Testes para realizar as medições do Cálcio, Dureza Carbonada, Nitratos e Fosfatos.

Tabela I - Parâmetros físico-químicos padrão para a manutenção dos *Discosoma* sp..

Parâmetros	Valor
Temperatura	25,5°C (+/- 1°C)
Salinidade	35 ppt (+/- 1 ppt)
pH	8,0 a 8,4
Cálcio (Ca)	400 a 450 ppm
Nitratos (NO ₃)	Não detectável
Fosfatos (FO ₄)	Não detectável
Dureza Carbonatada (KH)	9 a 11 dKH
Fotoperíodo	12 horas luz 12 horas escuridão

Realizaram-se limpezas regulares nos tanques, no sump, no filtro e no copo colector do escumador, de forma a impedir que se acumulasse matéria orgânica em altas

concentrações, o que conduziria ao desequilíbrio do sistema. Os tanques e o sump foram limpos através do método de remoção por aspiração (sifonagem) de resíduos e matéria orgânica depositadas e agarradas às superfícies das mesmas. Quinzenalmente fizeram-se mudanças de água salgada artificialmente, garantindo a manutenção das características físico-químicas iniciais da água.

Neste ensaio, foi utilizada água salgada artificial, produzida com água potável da rede municipal (água da torneira) filtrada através de um equipamento de osmose inversa (Aqualight; ST190) (Fig. 10). Para obter uma concentração de sal de 35 ppt na água, misturou-se sal sintético (Pro Reef – Tropic Marin) específico para aquários de recife, com água previamente filtrada pela osmose inversa, numa proporção de 0,850 kg de sal sintético por cada 20 litros de água, segundo as instruções do fabricante.

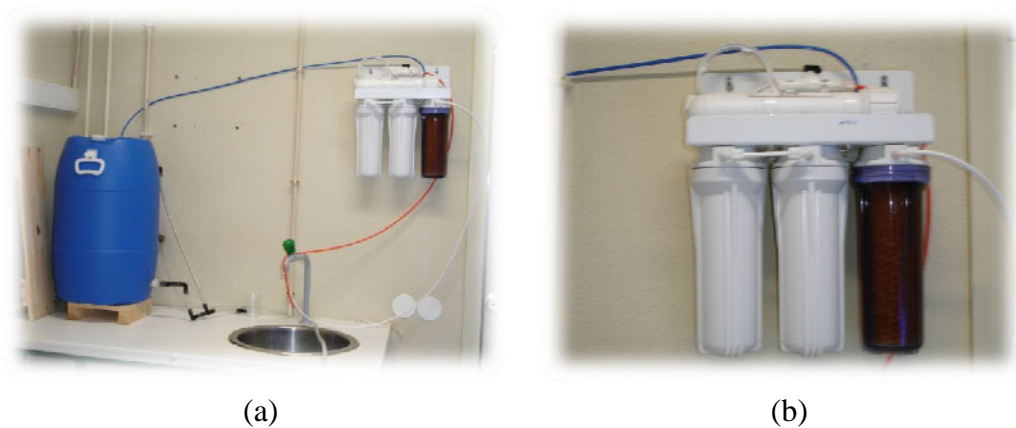


Fig. 10: a) Sistema de purificação de água da rede pública; b) Unidade de Osmose Inversa

Para a manutenção da salinidade no sistema, recorreu-se a um osmoregulador (ou bóia de nível) na sump ligado a um depósito com água de osmose, para dosear água, sempre que o seu nível baixasse, devido à ocorrência de evaporação

3. Desenho experimental

Com o objectivo de comparar o efeito de diferentes regimes luminosos na actividade fotossintética dos endosimbiontes *Symbiodinium* sp. (zooxantelas) nos indivíduos da espécie *Discosoma* sp., foram avaliadas características fisiológicas, relacionadas com a aclimatização destes aos LED`s. A resposta fisiológica dos endosimbiontes fotossintéticos associados aos *Discosoma* sp. em diferentes regimes luminosos, está relacionada com a fotossíntese, reflectindo-se na adaptação por parte destes organismos aos diferentes parâmetros ambientais em que são colocados, tal como a luz.

O estudo foi realizado a fim de compreender como a associação simbiótica dos *Discosoma* sp. e as suas zooxantelas, respondem a diferentes regimes luminosos, quando colocados em meio artificial com os restantes parâmetros ambientais constantes e sem distribuição de alimento. Este estudo compreendeu duas fases. Numa primeira, os 16 indivíduos *Discosoma* sp., obtidos da fragmentação, são colocados durante um período de 90 dias no tanque com iluminação LED branca, de forma a que se desse a recuperação completa e a aclimatização dos indivíduos (Fig. 11). Paralelamente são mantidos 4 indivíduos *Discosoma* sp. no tanque da colónia mãe, iluminada com lâmpada HQI (Hydrargyrum quartz iodide), durante o mesmo período de tempo, contudo estes indivíduos não necessitaram de passar pelo processo de recuperação, uma vez que não são indivíduos fragmentados.



Fig. 11: *Discosoma* sp. sob iluminação branca. a) Recuperação numa caixa de Petri com fragmentos de rocha viva; b) Aclimatização – fragmentos colocados em “coral cradle”.

A segunda fase do ensaio iniciou-se após o período de 90 dias, evitando-se que os factores recuperação e aclimatização fossem mais uma variável a influenciar os resultados finais. Assim, colocaram-se aleatoriamente 4 indivíduos *Discosoma* sp. em cada tanque, num total de 12 indivíduos e, em cada tanque, uma calha de iluminação com cor diferente (Fig. 12) (LED's 100% branca; 67% azul + 33% branca; 100% azul). Estes permaneceram sobre a influência da luz durante um período de 90 dias (de 22 de Janeiro a 22 de Abril de 2010).

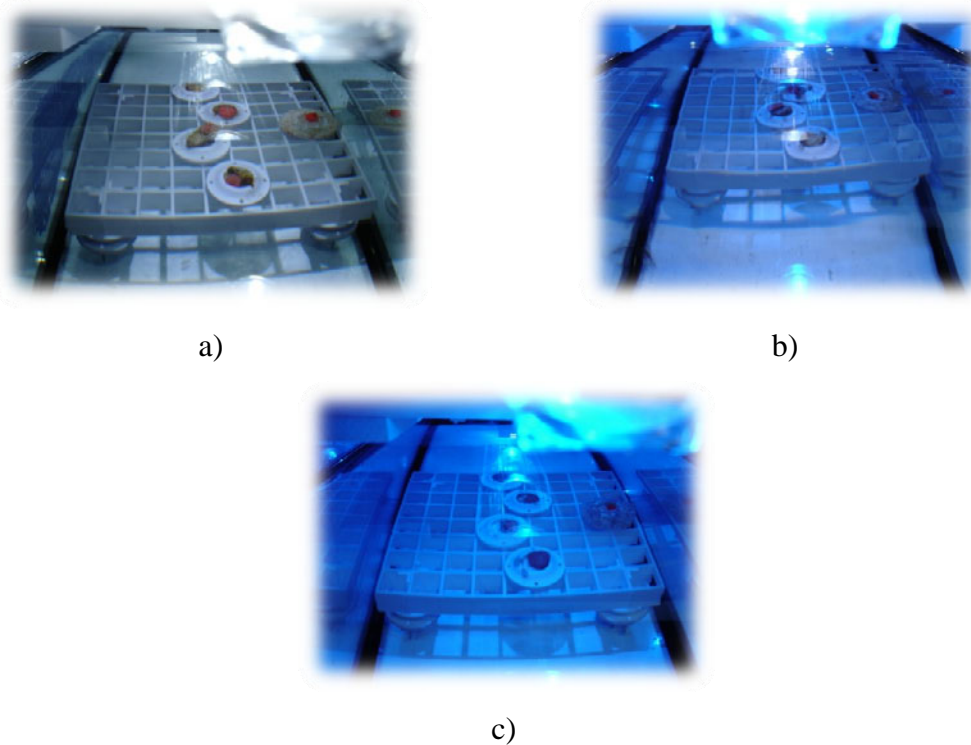


Fig. 12: Distribuição dos Discosoma sp. pelos tanques de ensaio, com diferentes cores de iluminação. a) LED 100% branca; b) LED 67% azul + 33% branca; c) LED 100% azul.

De forma a compreender o estado da simbiose do coral com os endosimbiontes *Symbiodinium* sp., realizaram-se medições no fim da primeira fase, período em que os corais estiveram em recuperação e aclimatização em LED branca e no fim dos 90 dias de ensaio, com as diferentes cores de LED's. Estas medições permitem que se analise e compare a quantidade de endosimbiontes que se encontram no coral e a quantidade de fotossíntese realizada por estes.

4. Técnicas de monitorização e medição

Para obtermos a informação se os indivíduos se encontravam adaptados aos diferentes regimes luminosos, foram feitas medições em duas fases do ensaio. A primeira foi realizada após o período de recuperação/aclimatização, em **3 indivíduos** do tanque iluminado com LED 100% branca – Ds1, Ds2, Ds3 e em **3 indivíduos** da colónia mãe iluminados com luz HQI – Ds4, Ds5, Ds6. Desta forma, sabemos como os corais-cogumelo se comportam quando passados da luz HQI para LED 100% branca, uma vez fragmentados. Este momento é denominado por **Pi** (ponto inicial). A segunda medição ocorreu ao fim do período/ensaio de 90 dias, onde se iluminou com as diferentes cores de LED. Esta medição gerou os seguintes valores dos **Pf**s (pontos finais): Pf_b (Ds7, Ds8, Ds9), Pf_{a+b} (Ds10, Ds11, Ds12) e Pf_a (Ds13, Ds14, Ds15). As medições finais são respeitantes aos tanques com iluminação branca, azul + branca e azul, respectivamente.

Para evitar que os indivíduos entrem em stress antes das medições, o que causaria a libertação da zooxantela devido a alteração ambiental, foram colocados num recipiente com água salgada retirada do sistema de suporte de vida, mantendo igualmente a temperatura a que se encontravam. Somente os indivíduos que iriam ser medidos foram retirados do tanque de ensaio, garantindo que não haveria mistura entre os indivíduos colocados nos diferentes regimes luminosos, como também os restantes, não se encontrariam durante um período muito longo fora do sistema, garantindo-se que o tempo desde a recolha dos indivíduos, do tanque de ensaio, até à medição, seria igual para todos os ensaios. No laboratório, os indivíduos foram colocados, individualmente, em placas de Petri identificadas (para não ocorrer troca de organismos) e submersos com água salgada.

As medições consistiram em realizar testes aos *Discosoma* sp. na seguinte sequência: análise espectral de reflectância, utilizando um espectroradiómetro e medição fluorescência da clorofila, utilizando um fluorómetro PAM. Estas técnicas são realizadas cuidadosamente em cada animal, mantendo uma distância fixa entre coral e a fibra óptica do espectroradiómetro e do fluorómetro.

4.1. *Análise espectral de reflectância*

A obtenção de espectros de reflectância, para identificar a quantidade de fotossíntese realizada pela clorofila *a* dos endosimbiontes dos corais tem sido foco de diversos estudos nos últimos anos (Stambler & Shashar, 2007; Hochberg et al., 2003; Hochberg et al., 2004). Desta forma podemos obter a informação de mudanças na quantidade de biomassa de zooxantelas, como também da saúde do coral.

Outros autores procuram diferenças na reflectância espectral dos corais, utilizando como principais variáveis a taxonomia e diferentes pontos geográficos, determinando grupos de pigmentos característicos (Hochberg et al., 2004).

O espectro de reflectância é a relação entre a radiação que é reflectida e a absorvida pelas zooxantelas, sendo determinado pelo espectro de absorção dos pigmentos da zooxantela (entre eles a clorofila *a*; clorofila *c*; β -carotenos) (Hochberg et al., 2003). Este espectro permite a identificação de pontos onde o comprimento de onda é máximo e/ou mínimo.

A quantidade de *clorofila a* foi comparada através de índices de reflectância, que se baseiam nas variações de coloração, estando relacionada com variações na simbiose zooxantela/coral.

As medições foram realizadas utilizando um espectroradiómetro (Ocean Optics; USB2000) (Stambler & Shashar, 2007), sincronizado com um software específico (OOIBase 32 – versão 2.0.5.2), com tempo de integração de 500 ms e uma média de 3 ciclos. As amostras foram expostas a iluminação, recorrendo à utilização de uma lâmpada de halogéneo (Philips; Plusline 150 W R7s).

Os registos dos espectros foram feitos para o intervalo de comprimento de onda compreendido entre os 330 nm e os 1000 nm, com uma resolução espectral de 0,33 nm. Ligou-se uma fibra óptica de 400 μ m de diâmetro (Ocean Optics, QP400-2-VIS/NIR-BX) ao espectroradiómetro (Fig. 13a), posicionada perpendicularmente à superfície dos *Discosoma* sp. a uma distância aproximadamente de 4 cm (Fig. 13c), de modo a que o feixe de luz preenchesse todo o diâmetro do disco oral. Antes de realizar as medições, foi feita a calibragem do espectroradiómetro, que consistiu numa medição com um painel de referência (Ocean Optics, WS-1-SL Spectralon) denominado de branco padrão (Fig. 13b) e outra no escuro. Hochberg et al (2004) refere que a calibração do espectro

de reflectância, permite executar curvas com valores conhecidos, devendo ser feita à mesma distância a que os corais são medidos.

A fibra óptica foi colocada a uma distância de 40 mm, de modo a que o campo de visão pudesse abranger toda a superfície do animal. Foram realizadas no mínimo 3 medições por cada indivíduo, dando origem a 3 espectros para cálculos posteriores.

Os índices dos comprimentos de onda obtidos foram tratados usando como referência a reflectância do comprimento de onda dos 750 nm (Serôdio et al., 2010)



a)



1

b)



c)

Fig. 13: a) espectralradiômetro USB2000 b) calibração do espectralradiômetro com o branco padrão; c) medição de um indivíduo *Discosoma* sp. (1 – painel de referência branco padrão; 2 – lâmpada de halogéneo; 3 – Fibra óptica).

Recorrendo ao espectro de reflectância determinou-se o *NDVI* (*Normalized Difference Vegetation Index*), usado mundialmente para informar o vigor da fotossíntese, estimando um grande número de propriedades, tal como o índice da área foliar, biomassa e concentração de clorofila *a*. O valor numérico do NDVI é uma medida ou estimativa da quantidade de radiação que está a ser absorvida pelas zooxantelas. Esse índice é capaz de distinguir diferenças na produção de fotossíntese realizada pelos *Symbiodinium* sp. encontrados nos corais (Almeida & Reiser, 2007) e na absorção de energia por parte da clorofila *a*. Assim, quanto mais a clorofila *a* absorve a luz visível, mais fotossíntese é realizada e, por sua vez, mais produtivo se torna. Esta é uma técnica não destrutiva, nem invasiva para os indivíduos *Discosoma* sp..

A fórmula do NDVI foi inicialmente chamada de índice de vegetação, desenvolvida por Rouse et al. em 1973 (Rouse et al., 1974):

$$NDVI = \frac{IR-RED}{IR+RED} \Leftrightarrow NDVI = \frac{R750-R675}{R750+R675}$$

O valor de IR (ou R₇₅₀) corresponde aos valores de reflectância do comprimento de onda relativo ao infravermelho e RED (ou R₆₇₅) corresponde ao valor do vermelho. O valor do NDVI pode variar entre 0 e 1, em que valores mais próximos de 1 são correspondentes a maior produção de fotossíntese por parte dos endosimbiontes, observando-se variação no conteúdo em clorofila *a*.

Para obtermos um valor representativo do NDVI efectuou-se 3 medições em cada indivíduo, dando origem a 3 espectros de reflectância, de onde se obteve um valor médio dos comprimentos de onda 675nm e 750nm. Utilizou-se o mesmo procedimento para cada indivíduo dos 3 tratamentos experimentais.

4.2. *Fluorometria de Pulso Modelado – PAM*

Um parâmetro para caracterizar a simbiose entre o coral e a alga é medir a quantidade de *clorofila a*, normalmente com o recurso a métodos destrutivos, que levam à morte do animal, extraíndo os pigmentos para os poder contabilizar. A introdução do PAM (“Pulse Amplitude Modulation”), desenvolvida por Schreiber et al. em 1986, possibilitou realizar medições não destrutivas, uma vez que faz uma estimativa da quantidade de clorofila viva nas zooxantelas.

A fluorescência da clorofila *a*, está relacionada com a actividade fotossintética, claramente afectada pela exposição à luz, dependendo da duração e intensidade a que os fotossistemas estão expostos. As análises de fluorescência são baseadas no conhecimento de que todos os fotossistemas II, da *clorofila a*, podem ser fechados ao receberem um pulso de luz saturante. A emissão de fluorescência por parte dos fotossistemas II, permite avaliar a capacidade fotossintética das células vegetais (Schreiber et al., 1995).

A fluorometria de pulso modelado (PAM) tem sido uma metodologia fundamental nos estudos de alterações na fisiologia da fotossíntese dos endosimbiontes *Symbiodinium* sp. dos corais e no das modificações na actividade fotossintética em resposta a alterações ambientais. A fluorometria PAM, permite avaliar entre outros índices, o rendimento quântico potencial (F_v/F_m), que é a medida máxima da eficiência do PSII (Maxwell & Johnson, 2000; Takahashi et al., 2009), servindo como indicativo da quantidade total fotossíntese produzida por *Symbiodinium* sp. (Soffer et al., 2008).

A actividade fotossintética dos endosimbiontes *Symbiodinium* sp. encontrados nos *Discosoma* sp. foi medida de forma não invasiva e não destrutiva usando o fluorómetro PAM (Seródio et al., 2008; Vieira et al., 2009).

A medição da fluorescência da clorofila *a* foi feita utilizando o fluorómetro PAM (fig. 14), que é constituído por uma unidade de controlo e por uma unidade de emissão-deteccção Water-EDF-Universal (Gademenn Instruments GmbH). O seu funcionamento consiste na emissão de um pulso de luz actínica, excitante e saturante de

um LED azul, com pico de emissão a 450 nm, com largura de banda de 20nm (Vieira et al., 2009), utilizando um sistema de fibra óptica de 1,5 mm de diâmetro (Ocean Optics), com pulso de saturação de 1 μ seg. A fibra óptica foi posicionada perpendicularmente à superfície do indivíduo, fazendo-se as medições a uma distância fixa de 1 mm, controlada por um micromanipulador (MM33, M)

O fluorómetro foi calibrado antes de se iniciarem as medições, recorrendo ao disparo de um pulso de luz, através da fibra óptica, deste modo aos valores das medições é-lhes retirado o valor da luz presente no laboratório.

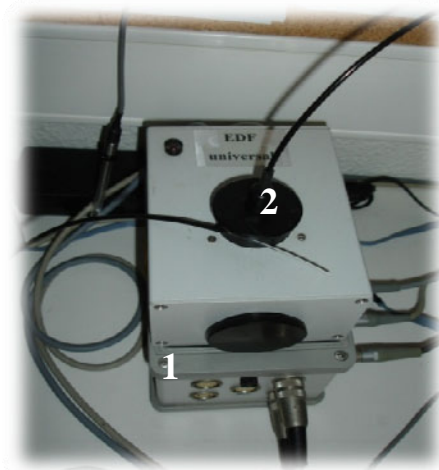


Fig. 14: Fluorómetro PAM (1 - unidade de controlo PAM; 2 - unidade de emissão-deteção Water-EDF-Universal)

Para realizar as medições fluorométricas utilizaram-se indivíduos colocados previamente em condições de escuro total durante 15 minutos, após as medições da análise espectral de reflectância, mantidos numa caixa de Petri com água salgada artificial, medindo-os pela mesma ordem em que foram colocados no escuro (Fig. 15a). Mantendo-se o laboratório sem luz, colocou-se a extremidade da fibra óptica junto da superfície do disco oral dos indivíduos, aplicando-se um pulso de luz saturante de forma a obter assim medições dos valores de F_v/F_m . Para cada amostra foram efectuados 5 pulsos de luz, feitos em diferentes pontos do disco oral (Fig. 15b), para que se obtivesse um valor representativo de cada indivíduo.

Para a quantificação do pigmento, foi calculado o rendimento máximo quântico dos fotossistemas II (Fv/Fm).

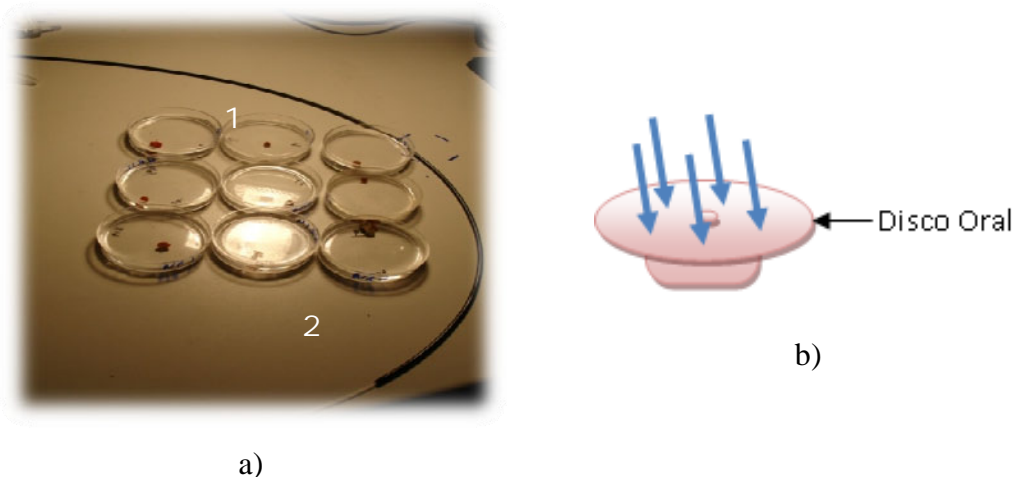


Fig. 15: a) fotografia dos *Discosoma* sp. depois da realização das medições como o PAM (1 – caixa de Petri; 2 – fibra optica b) Esquema das medições efectuadas no *Discosoma* sp..

5. Análise estatística

O objectivo deste trabalho foi responder à seguinte questão: -Terá a actividade dos endosimbiontes *Symbiodinium* sp. dos *Discosoma* sp. sofrido variações ao serem submetidos a diferentes regimes luminosos?

Para identificar e comparar diferenças entre os valores médios dos parâmetros fotofisiológicos das amostras iluminadas com diferentes cores de LED, fez-se uma análise estatística, recorrendo à utilização do software “Statistica ® 7 for Windows”. Os parâmetros Fv/Fm e NDVI, dos períodos Pi e Pf, foram comparados, sabendo que a variável dependente era a diferença na cor de LED, efectuando uma análise de variância (ANOVA one-way), de forma a confirmar se existiam diferenças significativas entre os indivíduos colocados nos diferentes regimes luminosos.

IV. Resultados

Os valores resultantes das medições serviram para comparar a actividade fotossintética dos endosimbiontes e a sua quantidade nos *Discosoma* sp., em diferentes Pfs (Anexo I – Tabela II). A medição do Pi dos indivíduos colocados em luz HQI serviu como indicador, permitindo assim compreender se ao serem fragmentados e colocados num novo regime luminoso (LED branca) estes organismos se fotoadaptariam (Anexo II – Tabela III).

1. Análise espectral de reflectância

Os espectros de reflectância realizada na superfície das amostras (n=9), dos diferentes tratamentos com LED's no período final do ensaio, estão figurados abaixo nas figuras 16, 17 e 18, onde é possível visualizar as variações da reflectância nos distintos comprimentos de onda, usando o 750 nm como referência. Esses espectros foram caracterizados por terem tido valores de reflectância baixos em todo o comprimento de onda visível.

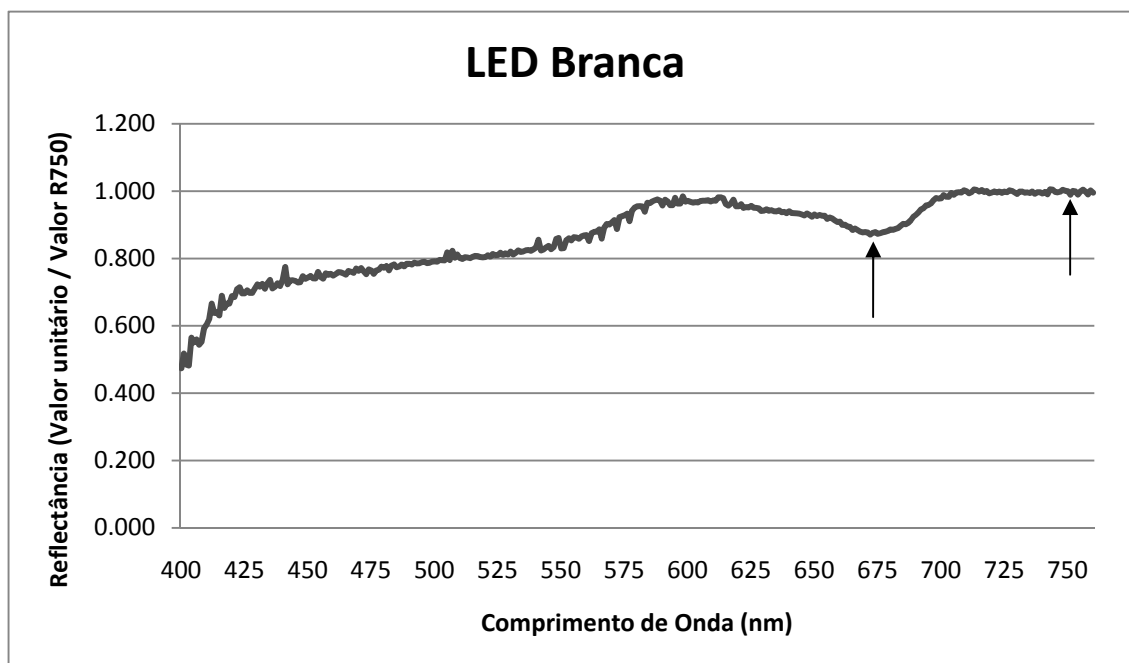


Fig. 16: Espectro de reflectância das medições dos indivíduos do regime luminoso com LED branca. Valores médios unitários usando como referência o comprimento de onda – 750 nm.

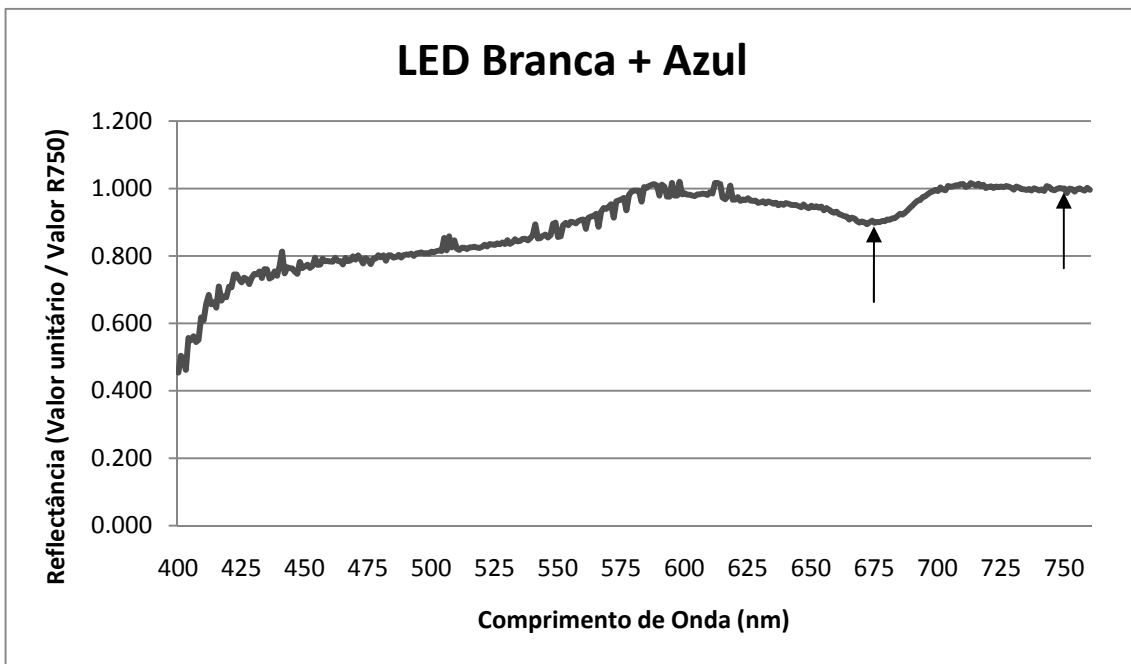


Fig. 17: Espectro de reflectância das medições dos indivíduos do regime luminoso com LED azul+branca (mista). Valores médios unitários usando como referência o comprimento de onda – 750 nm.

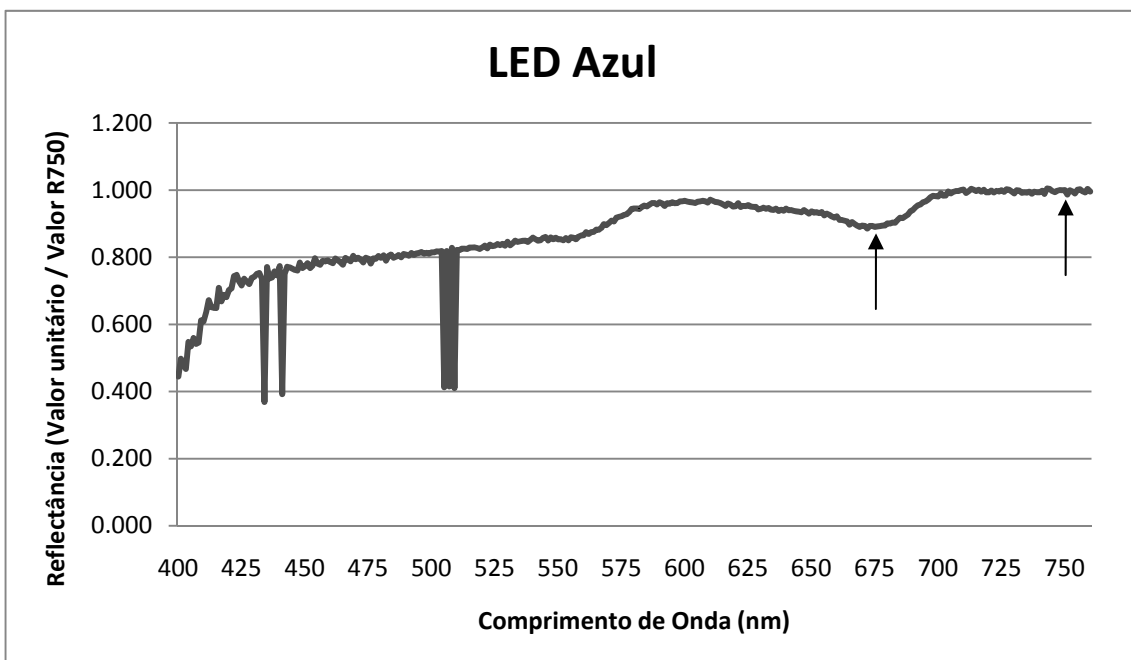


Fig. 18: Espectro de reflectância das medições dos indivíduos do regime luminoso com LED azul. Valores médios unitários usando como referência o comprimento de onda – 750 nm.

Nestes espectros é possível observar que existe um decréscimo da reflectância entre os 650-700 nm, que corresponde a um aumento da absorção da *clorofila a*. O valor máximo de absorção para o intervalo anterior dado foi, aproximadamente, de 672 nm.

O NDVI da zooxantela foi calculado através dos valores correspondentes aos 675 nm e 750 nm do espectro de reflectância. Os valores médios de NDVI em Pf, quando comparados com o regime luminoso de LED branca, evidenciaram uma redução nos ensaios com LED azul+branca e LED azul, em 35 e 25%, respectivamente. Os valores de NDVI para o regime com LED branca foi de 0,073 ($\pm 0,016$), LED azul+branca de 0,054 ($\pm 0,008$) e LED azul de 0,059 ($\pm 0,011$), como é possível observar na figura 19.

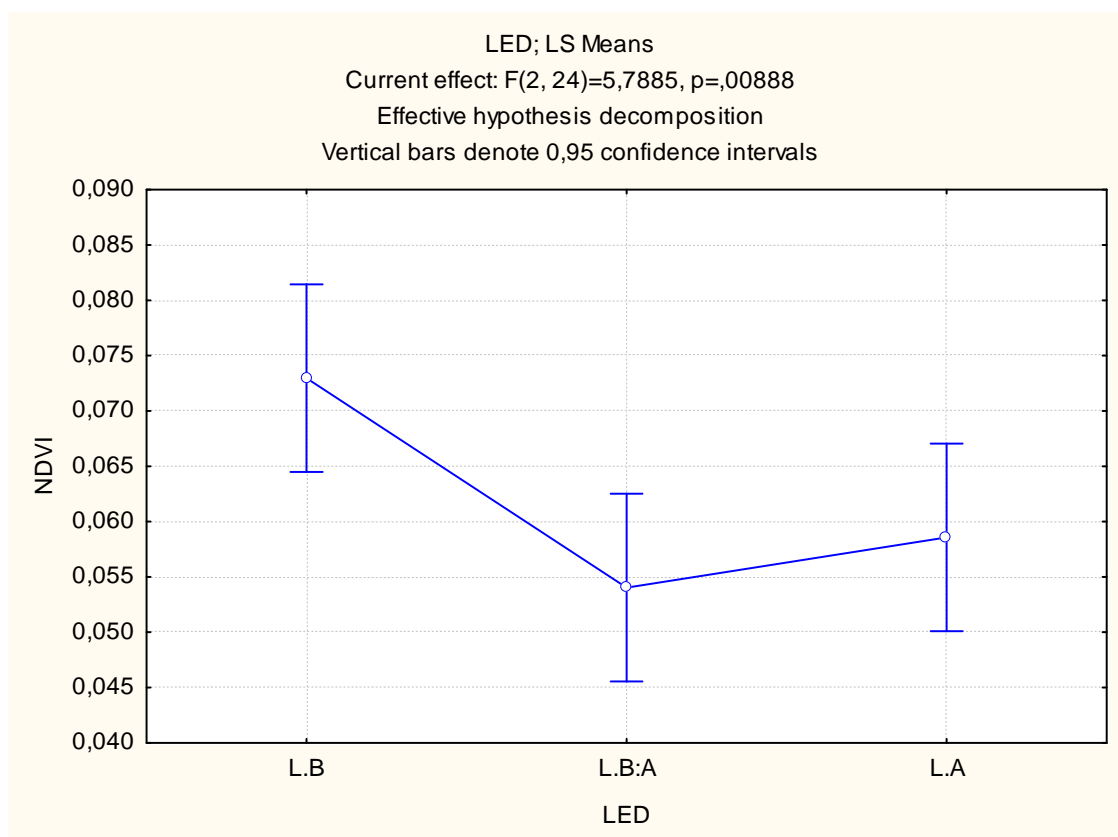


Fig. 19: Comparativo de valores médios e desvio padrão do NDVI em Pf nos tanques iluminados com as diferentes cores de LED (L.B – LED branca; L.B:A – LED azul+ branca; L.A – LED azul)

Nos valores obtidos das medições finais (Pf) foram encontradas diferenças significativas entre todos os tratamentos ($p < 0,05$; D.F. = 2; $F = 5,7885$) através da realização da ANOVA.

2. Fluorimetria de Pulso Modelado – PAM

O estado fotofisiológico dos indivíduos em ensaio é caracterizado pela medição do parâmetro F_v/F_m , onde foi observada variabilidade intra-regime luminoso e entre regimes luminosos, tal como pode ser observado na Tabela II (Anexo I). Obtivemos valores médios para o F_v/F_m de $0,159 (\pm 0,044)$, $0,280 (\pm 0,100)$ e $0,183 (\pm 0,075)$, para os ensaios com LED branco, azul+branco e azul, respectivamente, tal como pode ser observável na figura 20. Os valores do rendimento quântico potencial em Pf, quando comparados entre os diferentes regimes luminosos, os indivíduos em LED azul+branco encontram-se em melhor estado fisiológico, do que os LED branco e os LED azul.

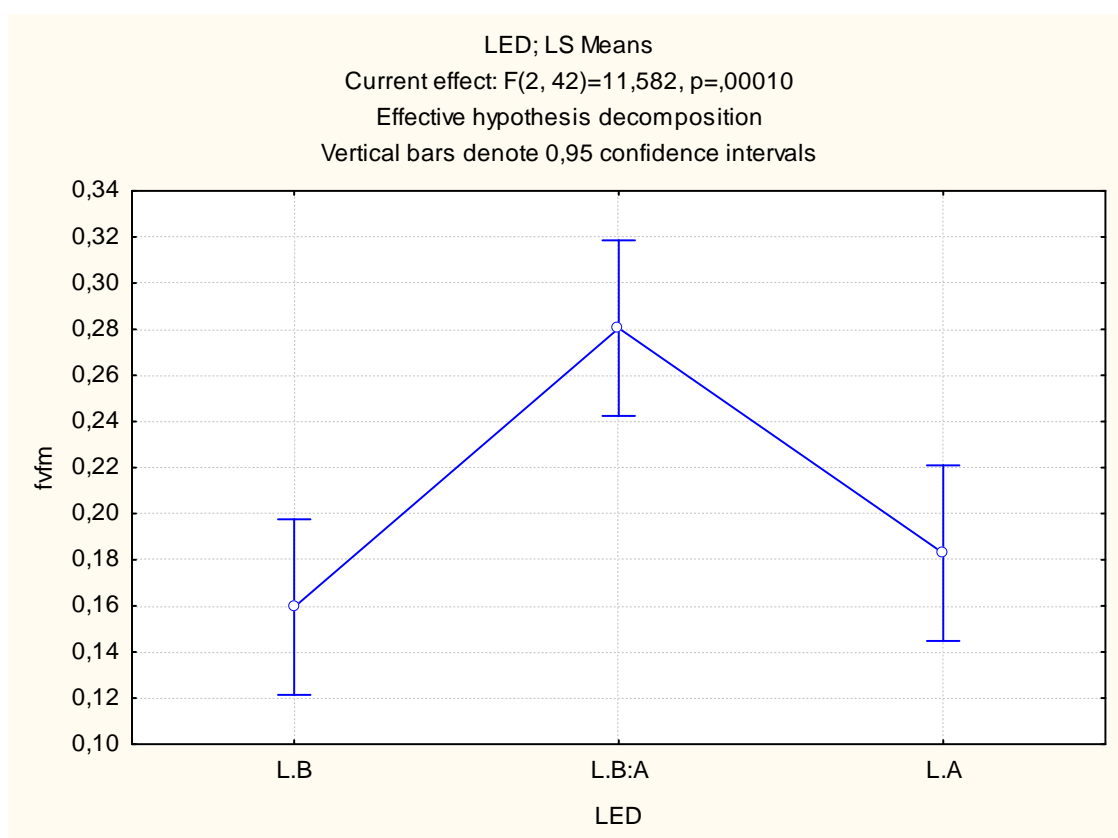


Fig. 20: Comparativo de valores médios e desvio padrão do F_v/F_m em Pf dos tanques iluminados com as diferentes cores de LED (L.B – LED branca; L.B:A – LED azul+branca; L.A – LED azul)

A ANOVA revelou a existência de diferenças significativas entre todos os tratamentos ($p < 0.05$; D.F. = 2; $F = 11,5823$) entre os resultados da reflectância (F_v/F_m) obtidos das medições finais (Pf) dos diferentes tanques do ensaio.

V. Discussão

Os estudos de fitobiologia desenvolvidos em animais marinhos, têm vindo a apresentar informações úteis no conhecimento da capacidade destes se adaptarem a alterações do meio ambiente. Relativamente a estudos deste tipo, ainda são insuficientes os dados existentes que mostrem como é regulada a simbiose entre dinoflagelados e os seus hospedeiros, principalmente no filo do Cnidário.

Para melhor entendermos as relações simbióticas, entre hospedeiro/hospede e as suas variações, utilizou-se um espectroradiómetro, anteriormente utilizado por Hochberg et al. (2004) em estudos de reflectância envolvendo corais e um fluorómetro PAM. Ambos os métodos utilizados na determinação da clorofila *a*, aparentam ser apropriados para a estimação da quantidade de algas simbióticas existentes nos *Discosoma* sp.. Uma vez que os índices de reflectância estão directamente relacionados com os pigmentos fotossintéticos, sabemos que variações no valor destes índices significa que existe variação na quantidade de clorofila *a*. Já as medições da fluorescência permitem determinar a quantidade de clorofila viva instantaneamente, sendo um método que não requer tratamento de dados demorado e complexo.

As provas realizadas no fim do período em que decorreu o ensaio coincidiram com a fase pós-recuperação e aclimatização dos indivíduos. Os resultados finais, não foram afectados pela fragmentação dos corais, uma vez que entre o dia em que foram fragmentados até ao que foram analisados, existiu um período de tempo de 180 dias.

1. Análise espectral de reflectância

Os corais ao iniciar o ensaio apresentavam, à vista desarmada, uma mesma tonalidade de cor, devido a terem permanecido durante um período de 90 dias em iluminação LED branca, onde se deu a recuperação e aclimatização dos indivíduos.

Os valores de biomassa dos endosimbiontes obtidos no presente estudo sugerem que os indivíduos iluminados com LED branca foram os que tiveram no final maior

índice de NDVI. Contudo, se observarmos os valores iniciais, apesar de indicativos, é visível uma redução na biomassa dos endosimbiontes nos 3 ensaios, sendo os indivíduos iluminados com LED branca, os que tiveram menor redução de biomassa. Os autores Secord & Muller-Parker, em 2005, ao estudarem a distribuição de zooxantelas e taxas de crescimento baseadas na eficiência fotossintética em anêmonas com diferentes graus de iluminação, obtiveram valores médios de 0,021 nos NDVI. O que nos faz entender que, os nossos indivíduos em média, têm índices de vegetação superiores.

Entre indivíduos da mesma espécie pode existir variação no espectro de reflectância individual, o que por vezes não é possível detectar, à vista desarmada, pois não existem diferenças na cor dos corais. Os valores obtidos por estes espectros são uma boa ferramenta para o reconhecimento da cor real do coral, uma vez que visualmente apresentam uma cor, que pode não ser a cor real, devido às características da visão do ser humano (Stambler & Shashar, 2007; Hochberg et al., 2004). Os *Discosoma* sp. de pigmentação vermelha utilizados neste ensaio, são disso exemplo, em que a cor do coral não dependeu da espécie, mas das condições ambientais onde se encontravam inseridos, tais como diferenças na luminosidade.

Para a realização de fotossíntese é necessário que exista exposição ao sol (ou outra fonte de luz), que inclui a radiação disponível para a fotossíntese, no comprimento de onda entre os 400-700nm e a radiação ultra violeta, entre os 280-400nm, que é fotoquimicamente prejudicial à simbiose (Furla et al., 2005).

Nos organismos aquáticos fotossintéticos, a reflexão da luz no comprimento de onda dos 675 está inversamente correlacionada com a concentração da clorofila (Stambler & Shashar, 2007; Hochberg et al., 2003). Ou seja, quanto mais luz é reflectida, menos é absorvida pela clorofila, o que permite deduzir uma menor existência de zooxantelas (Hochberg et al., 2004). Na observação das figuras 16, 17 e 18 é possível verificar que ocorre um ligeiro abaixamento da linha do espectro de reflectância, no intervalo de 650 e 700nm. Esta redução não é superior aos 20 %, quando comparado com valor de reflectância no comprimento de onda dos 750 nm.

De qualquer modo, os corais situando-se a diferentes profundidades, ou iluminações, apresentam variação no espectro de reflectância (Stambler & Shashar, 2007). No entanto as variações encontram-se dentro de determinados limites, desde que o coral seja saudável (Hochberg et al., 2004), apresentando uma curva tipo de espectro

de reflectância, como é visível nos 3 regimes luminosos testados. A razão para tal suceder, é devido à composição química dos pigmentos fotossintéticos das algas, sendo estas quem determinam os valores espectrais.

A diminuição da quantidade de fotossíntese realizada pelos endosimbiontes, é explicada por diversos autores (Hochberg et al., 2004; Stambler & Shashar, 2007), como reacção a alterações ambientais, tais como salinidade, temperatura e nutrientes na água, que causa a diminuição da concentração dos pigmentos, devido principalmente ao afastamento das zooxantelas do coral.

Tendo em conta que os valores do índice de vegetação foram reduzidos em todos os tratamentos e se garantiu a permanência dos parâmetros ambientais ideais a esta espécie, com as sucessivas medições de temperatura, pH, salinidade e nutrientes na água, as explicações para a obtenção destes valores são: a inadaptação dos corais a este tipo de iluminação ou a proximidade a que foram colocadas as calhas de LED`s em relação aos indivíduos, ou ainda, a possibilidade de ser uma conjugação destes dois factores.

2. Fluorometria de Pulso Modelado – PAM

A utilização da fluorometria PAM neste estudo, apesar de ser uma técnica recente de medição da fluorescência da clorofila (Beer et al., 1998; Serôdio et al., 2008; Vieira et al., 2009), mostrou ser rápida e simples para identificar diferenças na actividade fotossintética das algas endosimbióticas dos *Discosoma* sp..

Já anteriormente foi utilizada para fazer medições em algas simbióticas, na detecção de diferenças entre distintas aclimatizações, identificando ambientes onde estas melhor se adaptam (Iglesias-Prieto & Trench, 1997; Schreiber et al., 1995).

Ralph et al. (2002) ao medir com o PAM a fluorescência em 6 espécies de coral diferentes, constatou que os pólipos que se encontram em zonas com menos luz necessitam de ter maior quantidade de clorofila e a quantidade de zooxantela mantém-se independente da luz, uma vez que existe uma adaptação da população de *Symbiodinium* sp. existente no coral. Independentemente onde os pólipos estejam fixados, encontram-se sempre orientados na direcção da luz, assim regiões das colónias de coral que estejam mais expostas, têm subtipos de zooxantela mais adaptadas a esta situação, tal como acontece em regiões com uma exposição à luz mais deficiente.

A determinação do rendimento quântico máximo de *Symbiodinium* sp. em outras espécies de corais, obteve valores dentro do intervalo 0,4-0,6 (Ralph et al., 2002; Soffer et al., 2008; Takahaski et al., 2009), que poderão ser afectados pela luz, causando a inibição dos endosimbiontes e, interrompendo o processo da fotossíntese (fotoinibição). Os fotossistemas II de *Symbiodinium* sp. ao receberem radiação superior ao normal, diminuem a sua capacidade de realizar fotossíntese, devido à danificação dos tilacoides, o que promove a inibição do Ciclo de Calvin. Os valores de fotoinibição voltam ao normal, quando os corais se encontram em zonas de pouca luz (Takahaski et al., 2009). A interrupção da fotossíntese, leva ao rompimento da simbiose entre o endosimbionte e o coral, provocando o branqueamento deste.

As medições iniciais (P_i), apesar de terem sido feitas com finalidade indicativa e não comparativa, ao observar os valores do F_v/F_m obtidos pelos indivíduos, não fragmentados, que se encontram sobre o regime luminoso feito com lâmpadas HQI, apresentam melhor estado fisiológico, com valor médio de 0,603 ($\pm 0,055$), próximo do

valor óptimo (0,7). Enquanto os indivíduos fragmentados e colocados a recuperar e aclimatizar no tanque com calha LED de cor branca, apresentaram um valor médio de 0,269 (\pm 0,050). A diminuição pode ser causada pelo stress da mudança de regime luminoso e ao processo de fragmentação. Por outro lado, o aquário com iluminação HQI pode criar, aparentemente, melhores condições ambientais aos seus habitantes, do que os utilizados no ensaio, devido ao seu maior volume e ao permitirem que a distância entre os indivíduos e as calhas de iluminação seja superior.

O estado fisiológico dos *Discosoma* sp. testados, segundo os valores de Fv/Fm, aparentam não estarem muito saudáveis, uma vez que, os valores do rendimento quântico potencial se encontravam entre 0,159 (LED branca) e os 0,280 (LED azul+branca), situados muito abaixo do valor óptimo (0,7). Apesar dos resultados fluorométricos dos corais do tanque iluminados com LED azul+branco terem sido significativamente melhores aos iluminados com LED branca e LED azul, comparativamente aos valores médios desta espécie, quando colocadas sobre influência de iluminação HQI, também continuarem bastante baixos.

A utilização da iluminação LED azul+branca permitiu que os indivíduos realizassem, em valor, mais fotossíntese, logo, maior concentração de *clorofila a*. As variações individuais detectadas são em resposta aos diferentes regimes de iluminação, rejeitando as restantes condições ambientais uma vez controladas, monitorizadas e mantidas em valores padrão. Igualmente, as alterações genéticas não são causadoras de variações, dado ter-se recorrido à utilização de indivíduos monoclonais fragmentados (clones).

As variações na coloração dos corais pode ser uma resposta à redução da taxa de fotossíntese, causada pela redução dos níveis de *clorofila a*, ou seja, menos unidades fotossintéticas por alga simbiótica, ou então, menos algas simbióticas presentes no tecido do animal. Uma evolução negativa dos valores de Fv/Fm, é indicadora da degradação da *clorofila a* e da ausência de síntese da mesma.

A exposição das algas a alta intensidade solar pode provocar o rompimento da simbiose (Vieira et al., 2009) e, em casos extremos, a morte dos corais, o que leva a uma diminuição nos valores do rendimento quântico potencial (Fv/Fm), em comparação com os corais que estão expostos a uma intensidade luminosa confortável, que é variável de espécie para espécie.

3. Conclusão

A degradação dos recifes de coral está a aumentar o interesse por estes seres vivos, para tal, o conhecimento da sua fotobiologia é essencial para uma melhor compreensão dos corais. Apesar de já ser possível realizar ensaios com dinoflagelados separados do seu hospedeiro (Yellowlees et al., 2008), o estudo conjunto hospedeiro/simbionte torna-se uma valiosa ferramenta, pois permite a confirmação da associação simbiótica.

Embora não se verifiquem melhorias, a curto prazo, na utilização das calhas de iluminação LED na fotobiologia destes corais, ao comparar os 3 regimes luminosos podemos concluir que os indivíduos colocados no regime luminoso de LED azul+branca, apesar de conter menos biomassa de zooxantela, realizaram fotossíntese mais eficazmente.

Segundo os valores de F_v/F_m obtidos, quando se usou LED`s branca ou azul, os *Discosoma* sp. apresentaram piores resultados, quando comparados com os obtidos pelos indivíduos em LED`s azul+branca. É de ter em conta que os indivíduos inseridos no tanque de ensaio com iluminação LED azul+branca, apesar de terem sido os que tiveram índices NDVI inferiores, 0,054 ($\pm 0,008$), foram os que apresentaram valores de rendimento quântico potencial (F_v/F_m) superiores aos dos outros tanques, 0,280 ($\pm 0,100$). Embora com menos zooxantelas, como indica o índice de vegetação, estas são mais eficientes na realização de fotossíntese, segundo o valor de F_v/F_m . Assim podemos concluir que, apesar deste tipo de cor de iluminação não ter beneficiado as relações simbióticas entre alga e coral, as existentes foram bastante eficazes na produção da fotossíntese. E, sendo assim, maior benefício nutricional apresentaram estes corais.

De certa forma, os resultados obtidos foram ao encontro de outros estudos que demonstravam, que o excesso de energia luminosa incidente no aparelho fotossintético é pouco benéfico, dissipando o excesso de energia, para que não sejam prejudicadas as relações simbióticas entre alga e coral. Mesmo assim, não deverá ser posta de parte a ideia de que os resultados obtidos podem ter sido influenciados pela distância a que as calhas de iluminação LED se encontravam da superfície da água e dos *Discosoma* sp..

VI. Considerações finais

O trabalho realizado baseou-se na articulação de critérios teórico-práticos, com o objectivo de se conhecer um pouco mais sobre a interacção simbiótica das algas *Symbiodinium* sp. com o hospedeiro *Discosoma* sp., ao fazer variar um único factor, a cor de LED, com que se iluminava cada tanque do ensaio.

Obtivemos resultados satisfatórios nas provas de iluminação tipo LED, no que respeita à aprendizagem sobre o comportamento da fotobiologia destes corais. A utilização das técnicas de medição de espectrometria e fluorometria, recorrendo à utilização do espectroradiómetro e fluorómetro PAM, nesta espécie, é um tema pouco desenvolvido, tal como a informação de dados para a utilização deste tipo de iluminação.

Não se verificaram melhorias a curto prazo na fotobiologia dos *Discosoma* sp., talvez porque esta espécie de coral, não seja a mais adequada à realização de ensaios com LED's. A utilização deste tipo de iluminação em aquários com corais é ainda recente no sector da aquariofilia e mesmo na aquacultura, não estando ainda muito difundida. Contudo, algumas das suas características, torna-a de grande interesse, tais como a durabilidade, a manutenção do espectro (cor da luz), a homogeneidade da luz no aquário e o fácil manuseamento. Estas características justificam o elevado investimento inicial.

Sugiro aos detentores de aquários de coral, que:

- adequem a altura da iluminação e o fotoperíodo às espécies, procurando realizar pequenas variações nestes parâmetros, até encontrar um ponto em que os corais se apresentem visivelmente saudáveis. Avaliações mal feitas destes dois parâmetros, dão origem a stress fotobiológico nos indivíduos, conduzindo a perdas.

- a manutenção e limpeza dos tanques e acessórios deve ser feita com regularidade, evitando assim o desenvolvimento de outras algas nocivas aos corais e que concorram directamente com os endosimbiontes.

Seria conveniente realizar um acompanhamento mais prolongado, utilizando este tipo de iluminação, não só nesta espécie, como também noutras de igual interesse para a indústria da aquacultura e farmacêutica. O estudo destes organismos permite identificar condições ambientais que favoreçam as relações simbióticas/mutualistas entre parceiros, gerando mais biomassa de coral.

Deixamos em aberto novos estudos sobre a matéria, tendo em atenção a especificidade de cada espécie e a realidade diferente dos ambientes.

Bibliografia

- **Abrego, D.; Ulstrup K. E.; Willis B. L.; Madeleine; Oppen J. H. Van** (2008). *Species specific interactions between algal endosymbionts and coral hosts define their bleaching response to heat and light stress*. Proceedings of the Royal Society B. n.º 275, p. 2273–2282.
- **Almeida A. Q.; Reisen V. A.** (2007) *Uso do “Normalized Difference Vegetation Index” na análise fonológica da vegetação da reserva biológica de Sooretama*. Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia, n.º. 2. p. 60-66.
- **Alves, R. M. L.** (2009). *Corais: Montagem e Manutenção do Aquário*. Universidade de Aveiro, Portugal.
- **Barnes, R.** (1987). *Invertebrates Zoology*. 5th edition. Orlando, USA.
- **Beaumont, A.; Cassier, P.** (1978). *Biologie animal – dès Protozoaires aux Métazoaires epithélioneuriens*. 2th edition. Dunod Université. Paris, France. p.101 – 135.
- **Beer, S.; Ilan, M.; Eshel, A.; Brickner, I.** (1998). *Use of pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry for in situ measurements of photosynthesis in two Red Sea faviid corals*. Marine Biology n.º 131, p. 607–612.
- **Boué, H.; Chanton, R.** (1974) *Zoologie – I Invertébrés*. 4th edition; Doin éditeurs; Paris, France. p. 256 – 281.
- **Brusca, R. C.; Brusca, G. J.** (1990). *Invertebrates*. Library Resources, USA. p. 211-257.
- **Carte, B. K** (1996). *Biomedical potential of marine natural products*. Bioscience, n.º 46, p. 271-286.
- **Castro, P.; Huber, M.** (2008). *Marine Biology*. 7th Edition. McGraw-Hill International Edition, New York – USA. p. 303 – 327.
- **Delbeek, J. C.** (2001). *Coral farming: past, present and future trends*. Aquarium Science and Conservation, n.º 3, p. 171 – 181.
- **Demers, C.; Hamdy, C. R.; Corsi, K.; Chellat, F.; Tabrizian, M.; Yahia, L.** (2002). *Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review*. Bio-medical Materials nad Engineering , n.º 12, p. 15-35.

- **Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.** (2009). *Marine Antimalarials*. Marine Drugs, n.º 7, p. 130-152.
- **Furla, P.; Allemand, D.; Shick, J. M.; Ferrier-Page`s, C.; Richier, S.; Plantivaux, A.; Merle, P.; Tambutte, S.** (2005). *The Symbiotic Anthozoan: A Physiological Chimera between Alga and Animal*. Integrative and Comparative Biology, n.º 45, p. 595–604.
- **Gadelha, J. R.** (2007). *Estudos Ecológicos Preliminares e Caracterização Química dos Cnidaria da Costa Noroeste Portuguesa*. Universidade de Aveiro. Portugal.
- **Gomes, A.; Schaff, B.** (2008). *Zooxanthella: uma breve perspectiva*. In Bioaquaria, Janeiro/Fevereiro, p. 48 – 53.
- **Hadorn, E.; Wehner, R.** (1978). *Zoologia geral* (tradução de Cunha, A.; 3ª edição) Fundação Calouste Gulbenkian; Lisboa; Portugal. p. 307 – 315.
- **Hennege, S. J.; Suggett, D. J.; Warner M. E.; McDougall, K. E.; Smith, D. J.** (2009). *Photobiology of Symbiodinium revised: bio-physical and bio-optical signatures*. Coral Reefs, n.º 28, p. 179 – 195.
- **Henriques, M.^a**, (1998). *Manual de aquacultura*. (1ª edição). Porto, Departamento de Produção Aquática, Instituto de Ciências biomédicas de Abel Salazar, Universidade do Porto, p.11-31.
- **Hochberg, E. J.; Atkinson, M. J.; Andréfouët, S.** (2003). *Spectral reflectance of coral reef bottom-types worldwide and implications for coral reef remote sensing*. Remote Sensing of Environment, Volume 85, n.º 2, p.159-173.
- **Hochberg, E. J.; Atkinson, M. J.; Andréfouët, S.** (2004). *Spectral reflectance of coral*. Coral Reefs, n.º 23, p. 84–95.
- **Iglesias-Prieto, R.; Trench, R.** (1997). *Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Response of chlorophyll-protein complexes to different photon-flux densities*. Marine Biology, n.º 130, p. 23-33.
- **Jessop, N. M.** (1999). *Zoology*. McGraw-Hill Book Company. Columbus, USA.
- **Kleypas, J. A.; Feely, R. A.; Fabry, V. J.; Langdon, C.; Sabine, C. L.; Robbins, L. L.** (2006). *Impacts of Ocean Acidification on Coral Reefs and Other Marine Calcifiers: A Guide for Future Research*. sponsored by National Science Foundation, National Oceanic and Atmospheric Administration, and the U.S. Geological Survey, p. 1-88.

- **Kumar Jha, R.; Zi-rong, Xu** (2004). *Biomedical Compounds from Marine organisms*. Marine Drugs, n.º2, p. 123-146.
- **Kuguru, B.; Chadwick, N. E.; Achituv, Y.; Zandbank, K.; Tchernov, D.** (2008). *Mechanisms of habitat segregation between corallimorpharians: photosynthetic parameters and Symbiodinium types*. Marine Ecology Progress Series, n.º 369, p. 115 – 129.
- **Levinton, J. S.** (1995). *Marine Biology: funcion, biodiversity, ecology*. Oxford University Press. New York. p. 306-319.
- **Mayer, A. M. S.; Rodriguez, A. D.; Berlinck, R. G. S.; Hamann, M. T.** (2009). *Marine pharmacology in 2005–6: Marine Compounds with Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antifungal, Antiinflammatory, Antimalarial, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; affecting the Cardiovascular, Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action*. Biochim Biophys Acta. Illinois - U.S.A. p. 283 –308.
- **Maxwell, K.; Johnson, G.** (2000). *Chlorophyll fluorescence – a practical guide*. Journal of experimental botany, n.º 51, p. 659-668.
- **Messerli, S. M.; Greenberg, R. M.** (2006). *Cnidarian toxins acting on Voltage-gated ion channels*. Marine Drugs, n.º 4, p. 70-81.
- **Miles J.S.** (1991) *Inducible Agonistic Structures in the tropical Corallimorpharian, Discosoma sanctithomae*. The Biological Bulletin, n.º 180, p. 406-415.
- **Nicherson, D. J.; Baldwin, J.; Nosee, A.** (1997). *1997, año de los arrecifes*. FAO, Spain.
- **Pakoa, K.; Pickering, T.** (2001). *Marine Studies – A sexual propagation of a Corallimorpharian Disicosoma Sp. In closed system: A preliminary study on tolerance to cutting and methods of re-attachment*. The University of the South Pacific, Ilhas Fiji.
- **Pallela, R.; Na-Young, Y.; Kim, Se-Kwon** (2010). *Anti photoaging and Photoprotective Compounds Derived from Marine Organisms*. Mar. Drugs n.º 8, p. 1189-1202.
- **Pechenik, J. A.** (1996). *Biology of the Invertebrates*. 3rd edition. McGraw-Hill Book Company. Colombus, USA.
- **Portal São Francisco** (2002). *Filo Cnidária*. www.portalsaofrancisco.com.br

- **Ralph, P. J.; Gademann, R.; Larkum, A. W. D.; Kuhl, M.** (2002). *Spatial heterogeneity in active chlorophyll fluorescence and PSII activity of coral tissues*. Marine Biology, n.º 141, p. 639–646.
- **Rodrigues, A. M. J.** (1999). *Invertebrados*. Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal. p. 1-10.
- **Rouse, J. W.; Haas Jr., R. H.; Deering, D. W.; Schell, J. A.; Harlan, J. C.** (1974). *Monitoring the vernal advancement and retrogradation (green wave effect) of natural vegetation*. Type III final report. NASA/GSFC, Greenbelt, Maryland. p. 371.
- **Rudman, W. B.** (2000). *What are Zooxanthellae?*. [In] Sea Slug Forum. Australian Museum, Sydney. Available from.
- **Schreiber, U.; Hormann, H.; Neubauer, C.; Klughammer, C.** (1995). *Assessment of photosystem II photochemical quantum yield by chlorophyll fluorescence quenching analysis*. Australian Journal of Plant Physiology, n.º 22, p. 209-220.
- **Schreiber, U.; Schliwa, U.; Bilger, W.** (1986) *Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer*. Photosynthesis Research, n.º 10, p. 51–62.
- **Secord, D.; Muller-Parker, G.** (2005). *Symbiont distribution along a light gradient within an intertidal cave*. American Society of Limnology and Oceanography, n.º 50, p. 272–278.
- **Serôdio, J.; Pereira, S.; Furtado, J.; Silva, R.; Coelho, H.; Calado, R.** (2010). *In vivo quantification of kleptoplastic chlorophyll a content in the “solar-powered” sea slug *Elysia viridis* using optical methods: spectral reflectance analysis and PAM fluorometry*. Photochemical and Photobiological Science, n.º 9, p. 68–77.
- **Serôdio, J.; Vieira, S.; Cruz, S.** (2008). *Photosynthetic activity, photoprotection and photoinhibition in intertidal microphytobenthos as studied in situ using variable chlorophyll fluorescence*. Continental Shelf Research, n.º 28, p. 1363- 1375.
- **Silva, A. D.; Garmaxo, F.; Santos, M. E.; Mesquita, A. F.; Baldaia, L.** (2002). *Terra, universo de vida – 1.ª parte*. Porto editora. Portugal. p. 242-250.
- **Smith, K.** (2004). *Photobiological Science Online*. <http://photobiology.info/>
- **Soffer, N.; Gibbs, P. D. L.; Baker, A. C.** (2008). *Practical applications of contaminant-free Symbiodinium cultures grown on solid media*. 11th International Coral Reef Symposium, Session number 5.85, p. 159-163.

- **Sprung, J.** (2002). *Aquarium invertebrates – A review of the Corallimorpharia*. Advance aquarist's online magazine. <http://www.advancedaquarist.com>
- **Stambler, N.; Shashar, N.** (2007). *Variation in spectral reflectance of the hermatypic corals, Stylophora pistillata and Pocillopora damicornis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, n.º 351, p. 143–149.
- **Stickney, R.** (1994). *Use of hatchery fish in enhancement programs*. Fisheries, n.º 19, p. 5.
- **Storer, T. I.; Usinger, R. L.** (1965). *General Zoology – 4th edition*. McGraw Book Company. New York, USA.
- **Sumich, J. L.** (1996). *Na introduction to the biology of marine life*. 6th edition. C.Brown Publishers.
- **Takahashi, S.; Whitney, S. M.; Badger, M. R.** (2009). *Different thermal sensitivity of the repair of photodamaged photosynthetic machinery in cultured Symbiodinium species*. Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 106; n.º 9, p. 3237–3242.
- **Thiel, A.** (1997). *Mashroom Corals, Actinodiscus Types*. <http://aquafind.com/articles/mush.php> (24/05/2010).
- **Venn, A.; Loram, J.; Douglas, A.** (2008). *Photosynthetic symbioses in animals*. Journal of Experimental Botany, n.º 10, p. 1-12.
- **Vieira, S.; Calado, R.; Coelho, H.; Serôdio, J.** (2009). *Effects of light exposure on the retention of Kleptoplastic photosynthetic activity in the sacoglossan mollusc Elysia viridis*. Marine Biology, n.º 156, p. 1007 – 1020.
- **Yellowlees D.; Rees, T.A.V.; Leggat, W.** (2008). *Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts*. Plant, Cell and Environment, n.º 31, p. 679–694.

ANEXOS

Tabela II – Valores de Pf das medições Fv/Fm e NDVI.

	Tratamento	Indivíduos	Fv/Fm	NDVI
Pf	L.B	Ds7	0,227	0,0896
Pf	L.B	Ds7	0,157	0,0869
Pf	L.B	Ds7	0,208	0,0855
Pf	L.B	Ds7	0,155	
Pf	L.B	Ds7	0,177	
Pf	L.B	Ds8	0,172	0,0860
Pf	L.B	Ds8	0,243	0,0781
Pf	L.B	Ds8	0,161	0,0729
Pf	L.B	Ds8	0,142	
Pf	L.B	Ds8	0,166	
Pf	L.B	Ds9	0,099	0,0456
Pf	L.B	Ds9	0,150	0,0570
Pf	L.B	Ds9	0,136	0,0552
Pf	L.B	Ds9	0,077	
Pf	L.B	Ds9	0,122	
Pf	L.B:A	Ds10	0,184	0,0420
Pf	L.B:A	Ds10	0,240	0,0435
Pf	L.B:A	Ds10	0,448	0,0514
Pf	L.B:A	Ds10	0,381	
Pf	L.B:A	Ds10	0,197	
Pf	L.B:A	Ds11	0,269	0,0625
Pf	L.B:A	Ds11	0,313	0,0602
Pf	L.B:A	Ds11	0,207	0,0637
Pf	L.B:A	Ds11	0,199	
Pf	L.B:A	Ds11	0,328	
Pf	L.B:A	Ds12	0,216	0,0482
Pf	L.B:A	Ds12	0,466	0,0579
Pf	L.B:A	Ds12	0,200	0,0570
Pf	L.B:A	Ds12	0,385	
Pf	L.B:A	Ds12	0,174	
Pf	L.A	Ds13	0,273	0,0414
Pf	L.A	Ds13	0,105	0,0625
Pf	L.A	Ds13	0,235	0,0624
Pf	L.A	Ds13	0,169	
Pf	L.A	Ds13	0,141	
Pf	L.A	Ds14	0,157	0,0513
Pf	L.A	Ds14	0,105	0,0489
Pf	L.A	Ds14	0,128	0,0495
Pf	L.A	Ds14	0,346	
Pf	L.A	Ds14	0,212	
Pf	L.A	Ds15	0,166	0,0701
Pf	L.A	Ds15	0,146	0,0710
Pf	L.A	Ds15	0,176	0,0701
Pf	L.A	Ds15	0,195	
Pf	L.A	Ds15	0,189	

Anexo II

Tabela III – Valores de Pi das medições Fv/Fm e NDVI

	Tratamento	Individuos	Fv/Fm	NDVI
Pi	L.Bi	Ds1	0,185	0,1153
Pi	L.Bi	Ds1	0,245	0,1041
Pi	L.Bi	Ds1	0,259	0,1021
Pi	L.Bi	Ds2	0,212	0,0869
Pi	L.Bi	Ds2	0,282	0,0910
Pi	L.Bi	Ds2	0,302	0,0878
Pi	L.Bi	Ds2	0,214	
Pi	L.Bi	Ds3	0,295	0,0539
Pi	L.Bi	Ds3	0,304	0,0538
Pi	L.Bi	Ds3	0,341	0,0547
Pi	L.Bi	Ds3	0,316	
Pi	HQI	Ds4	0,652	0,0495
Pi	HQI	Ds4	0,667	0,0499
Pi	HQI	Ds4	0,679	0,0435
Pi	HQI	Ds5	0,638	0,0499
Pi	HQI	Ds5	0,563	0,0495
Pi	HQI	Ds5	0,569	0,0509
Pi	HQI	Ds6	0,543	0,0448
Pi	HQI	Ds6	0,561	0,0469
Pi	HQI	Ds6	0,551	0,0447