

INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS PARA MEDIR A
PRODUÇÃO PRIMÁRIA DO FITOPLÂNCTON MARINHO

Recebido em 12/agosto/1972

CLOVIS TEIXEIRA

Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo

SYNOPSIS

In this review certain basic aspects of techniques established for primary productivity studies are presented.

Some emphasis has been given to a critical review of techniques mainly devoted to estuarine and coastal phytoplankton of tropical waters.

The contents of this paper have been balanced along the lines of current research in marine primary production but only considering the basic methods needed to determine the primary production and standing-stock of phytoplankton. No attempt has been made to include some sophisticated methods, since the particular aim of the present manual is to become a useful guide for beginners in the field.

INTRODUÇÃO

O interesse nas investigações sobre a produção primária tem representado um impacto sobre os estudos quantitativos referentes à biologia marinha, pois, as mesmas são essenciais para as pesquisas sobre as relações tróficas e o fluxo de energia através da rede alimentar nos mares. Como diz Russel-Hunter (1970): "Consideration of organic productivity in aquatic environments has both applied and theoretical significance. With the increasing rates of human population expansion, marine and freshwater productivity will have to play an increasing part in world protein nutrition. Given appropriate levels of research and development, further improvements of existing fishing methods, in combination with entirely new kinds of exploitation of aquatic productivity, can provide a greatly increased supply of protein in the next decades".

Atualmente, o estudo da produção de matéria orgânica por parte do fitoplâncton vem se intensificando cada vez mais em quase todo o mundo, principalmente em áreas costeiras e oceânicas (Steedmann-Nielsen, 1954; 1955a, b; Steedmann-Nielsen & Jensen, 1957; Steedmann-Nielsen & Hansen, 1959; Mitchell-Innes, 1967 e outros).

Quando se trata, entretanto, de regiões internas de natureza estuarina ou de um complexo estuarino-lagunar, marginados por manguesais, os estudos referentes à produção primária são praticamente inexistentes, podendo-se citar os trabalhos de (Patten, 1966; Williams, 1966; Teixeira et al., 1969).

Levando-se em conta as características peculiares a estas regiões e a importância que as mesmas representam no mundo aquático, e ainda o estágio em que se encontra o país com relação aos estudos sobre produção primária, foi que nos propusemos a realizar este trabalho. A idéia fundamental é a de se fazer uma síntese de maneira simples e compreensiva de técnicas já estabelecidas, dentro de certos limites, porém, adaptadas para as nossas condições e similares, visando possibilitar o desenvolvimento de estudos sobre produção primária.

Incluimos, ainda, uma série de esquemas e fotografias sobre o equipamento e uma extensa literatura relativa ao assunto, a fim de auxiliar os principiantes.

A produção primária no mar é quase que exclusivamente ocasionada pelo fitoplâncton-autotrófico.

Quando se discute produção primária ou produtividade primária devemos ter em mente que as mesmas são concernentes à avaliação da capacidade de um ecossistema construir, às custas da energia externa, isto é, energia radiante e química, compostos orgânicos primários de alto potencial químico. Essa produtividade não deve ser confundida, por exemplo, com produtividade do zooplâncton ou dos peixes, uma vez que até agora não foi possível definir uma correlação entre essa produtividade e a produção primária.

A matéria orgânica é sintetizada pelas algas planctônicas unicelulares, sendo que os fatores oceanográficos e físicos afetam essas algas, tendo uma influência controladora na razão da produção primária.

A fotossíntese é um processo fundamental da produção primária, mas não devemos confundir os dois processos, uma vez que a produção primária não é idêntica à fotossíntese, pois o conceito compreende a quimiossíntese como fazendo parte da produção primária. Tendo em vista as nossas necessidades, restringimo-nos fundamentalmente ao fluxo do carbono, levando em consideração as diversas linhas da pesquisa atual em produção primária marinha. Quando consideramos o processo da fotossíntese, falamos sobre a produção primária de um modo geral; entretanto, a respiração sempre ocorre simultaneamente com a fotossíntese; temos então: fotossíntese-respiração = produção primária aparente.

Ainda com relação ao termo produção, devemos dizer que o mesmo tem sido empregado por alguns autores como sinônimo de "standing-stock"*. Entretanto,

* - abundância de organismos do fitoplâncton num dado momento expresso em número de células, peso seco ou em termos de pigmentos, por unidade de volume ou por área.

esse uso errôneo não pode ser cometido, pois a distinção é importante, especialmente quando comparamos o fitoplâncton com outros tipos de plantas ou com outros níveis tróficos. A matéria orgânica encontrada na população de fitoplâncton é o resultado da produção orgânica durante um certo número de dias, enquanto que o termo "standing-stock" é o valor instantâneo, da quantidade de matéria viva presente por unidade de água.

MÉTODOS PARA DETERMINAR A PRODUÇÃO PRIMÁRIA

As primeiras tentativas para avaliar e medir a produção primária do fitoplâncton no mar foram feitas na década de 1920-30. Atualmente, o estudo da produção da matéria orgânica por parte do fitoplâncton vem se intensificando cada vez mais, pois trata-se de um dos problemas básicos na ciência marinha.

A produção primária, isto é, a capacidade de um determinado ecossistema produzir material orgânico de alto potencial químico a partir de fontes de energia externa (radiante ou química), pode ser medida baseando-se diretamente na determinação da fotossíntese. Temos neste caso os chamados métodos diretos, que compreendem três categorias: pH, O₂, e CO₂.

MÉTODO DO pH - O método do pH, foi introduzido por Moore (Johnstone et al., 1924), que calculou a produção primária tomando por base as variações do pH da água do mar causadas pela assimilação e libertação do CO₂ através da fotossíntese e da respiração.

A variação do pH, entretanto, depende do efeito combinado de vários parâmetros, como temperatura, salinidade, fotossíntese e respiração, deposição de íons dos sistemas de buffer, principalmente carbonatos, e das trocas gasosas com a atmosfera.

Devido as muitas dificuldades que apresenta, esse método tem sido muito pouco utilizado. Park et al. (1958) construíram algumas curvas de variação diurna do pH para a produção primária de águas estuarinas. Verduin (1951; 1956), Odum (1957) e Frey & Stahl (1958) representam a maioria dos pesquisadores que adotou o método do pH com vistas à avaliação da produção primária no mar e em lagos.

MÉTODO DO OXIGÊNIO - Foi introduzido por Gaarder & Gran (1927). Com o decorrer dos anos foram feitas várias modificações, sem contudo alterar os fundamentos do método.

Em resumo, o método consiste em coletar amostras de água contendo fitoplâncton natural, colocando-as em frascos, e expondo-as à luz dentro da camada eufótica, isto é, nas mesmas profundidades de onde foram coletadas as amostras, ou utilizar alguma forma de incubadora iluminada através da própria luz do sol ou luz artificial (Fig. 1).

Quando se usa a primeira forma, os frascos devem ficar suspensos com o auxílio de cabos e de um flutuador (Fig. 2). As amostras coletadas são sifonadas para três tipos de frascos experimentais:

- a) - referência (âmbar);
- b) transparentes (incolor) e
- c) - pretos (opacos).

O início da operação é caracterizado pela fixação da amostra do frasco tomado como referência; a determinação da concentração do oxigênio dissolvido desta amostra, nos dará a concentração inicial (C_i).

A diferença entre esta titulação encontrada na amostra do frasco transparente, após ter sofrido uma exposição de luz por determinado tempo (C_t), dá-nos uma medida da fotossíntese aparente ($C_t - C_i$).

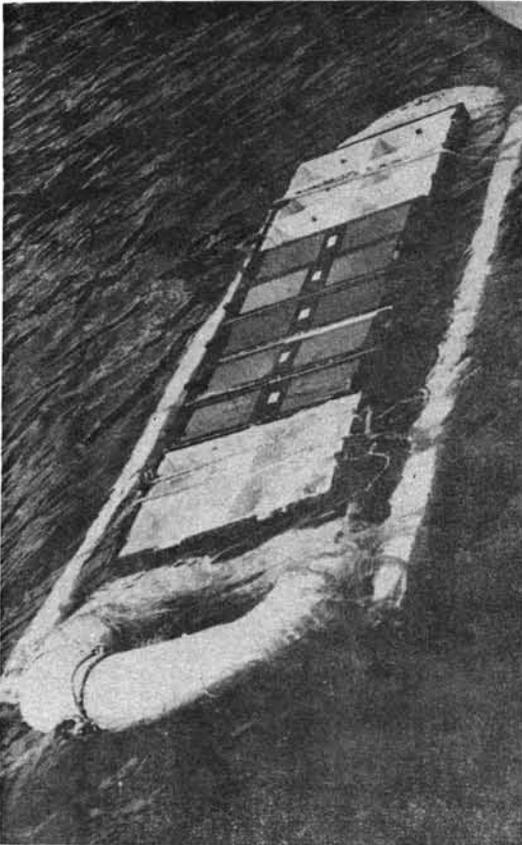


Fig. 1 - Fotografia de um incubador utilizado para o processo da exposição de amostras à radiação solar. O gradiente de energia é simulado por meio de filtros neutros colocados sobre as amostras, conforme mostra a fotografia.

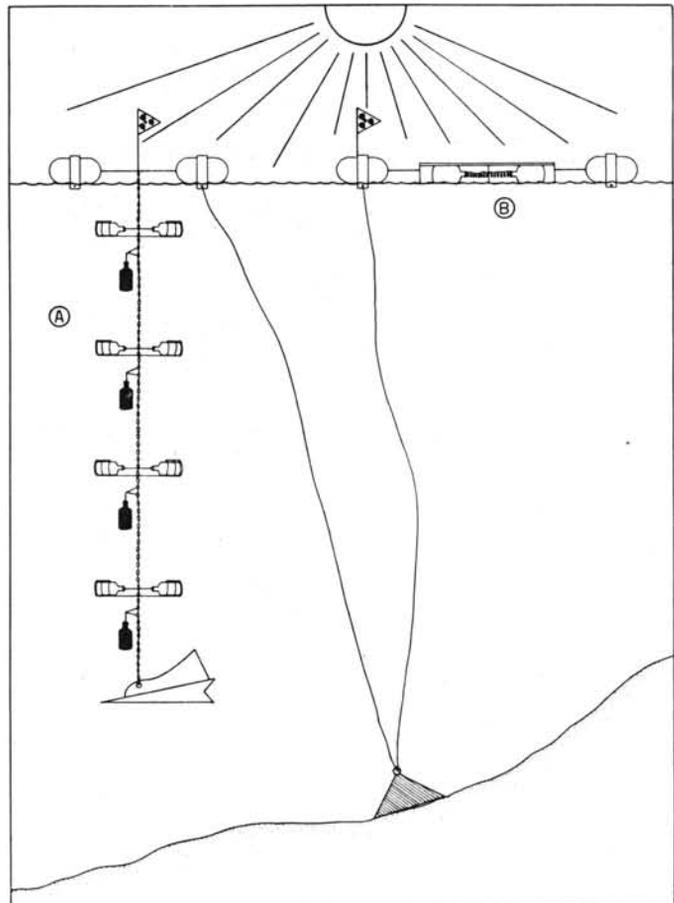


Fig. 2 - Esquema mostrando dois tipos de incubação: à esquerda o tipo de incubação "in situ" e à direita a incubação "in situ" simulada (a camada de água é substituída pelos filtros neutros).

Esse método é contudo mais utilizado para medir a produção total. Assim, a diferença entre o conteúdo do oxigênio dissolvido, encontrado na referência (C_i) e do oxigênio dissolvido encontrado na amostra do vidro preto (C_p), isto é, $C_i - C_p$, nos dá uma medida do consumo do oxigênio dissolvido, devido à respiração; supondo-se que este valor seja idêntico à respiração ocorrida na amostra do frasco transparente, basta adicionar ao valor da produção aparente o valor da respiração, obtendo-se desta maneira uma medida para a produção total:

$$(C_t - C_i) + (C_i - C_p) = (C_t - C_p)$$

não se levando em consideração a ocorrência de outros processos envolvendo o oxigênio, como por exemplo, consumos foto-oxidativos. Em resumo, temos:

$$\text{PRODUÇÃO TOTAL} = \text{PRODUÇÃO APARENTE (O}_2 \text{ libertado)} + \\ \text{O}_2 \text{ dissolvido gasto na atividade respiratória.}$$

$$P. \text{ total} = \text{ganho em } C_t + \text{perda em } C_p$$

$$P. \text{ total} = C_t + C_i + C_i - C_p$$

$$P. \text{ total} = C_t - C_p$$

Devemos, entretanto, levar em conta que nos mares e lagos, além da respiração das algas e bactérias autótrofas, ocorre também a respiração dos vegetais heterótrofos e dos organismos componentes do zooplâncton, que podem contribuir com uma parcela muito grande à respiração total.

O emprego do método do oxigênio nas condições de campo, possibilita-nos avaliar a taxa da produção total pelos organismos autótrofos do fitoplâncton, assim como a taxa da respiração de todos os organismos presentes na amostra.

Concluimos, portanto, que esta técnica não possibilita a avaliação da verdadeira produção aparente ("net production"). Os valores obtidos através do método do oxigênio fornece-nos os seguintes resultados:

PRODUÇÃO TOTAL NAS PLANTAS - RESPIRAÇÃO EM TODOS OS ORGANISMOS = PRODUÇÃO APARENTE DE UMA COMUNIDADE
--

A relação produção primária aparente : produção primária aparente de uma comunidade, pode apresentar um mínimo de variação até valores extremamente altos.

Discussão da técnica do oxigênio - As medidas do oxigênio dissolvido podem ser feitas quimicamente pelo método de Winkler ou através de determinações eletroquímicas. Na grande maioria das pesquisas realizadas sobre produção primária utilizando-se a técnica do "oxigênio", adotou-se o método de Winkler, pelas vantagens que o mesmo apresenta quanto à precisão ($\pm 0,02 \text{ mg/l}$) e pelas facilidades e simplicidade de aplicação do mesmo às condições de laboratório.

A precisão da técnica do "oxigênio" não depende apenas da precisão analítica da titulação, mas também, de inúmeras outras fontes de erros que podem ocorrer.

Uma das causas de erros mais frequentes pode ser a formação de bolhas nos frascos durante a incubação.

A maneira mais fácil de evitá-la, segundo Steemann-Nielsen (1958), é a de colocar os frascos abaixo da superfície, a 1 m de profundidade (há um aumento de 10% na pressão) onde nunca foi verificada a formação de bolhas. A produção de bolhas de ar, segundo Steemann-Nielsen (1958), deve-se ao aumento da temperatura durante o curso da experiência. Um dos modos mais práticos para evitar esse problema talvez seja o de coletar amostras em grandes volumes, agitá-las fortemente a fim de remover a supersaturação antes de encher os frascos a serem usados na experiência.

Em águas extremamente ricas em fitoplâncton a utilização deste método é às vezes impossibilitada, pois, quantidades significantes de iodo podem ser absorvidas pelo material oleoso do fitoplâncton, mascarando o resultado; contudo, segundo Strickland & Parsons (1960) a ocorrência de tal fato será muito rara no ambiente marinho.

Em águas extremamente pobres, a técnica apresenta pequena sensibilidade para medidas de experimentos de curta duração (pois, a produção é muito baixa), e em experimentos de longa duração, surge o problema relacionado com o crescimento das bactérias, quando a água está dentro dos frascos. Este método não pode ser aplicado para regiões com densidades de fitoplâncton expressas por concentrações de clorofila-*a* mais baixas do que 1 mg/m³.

Ao colocarmos as amostras de água no interior dos frascos, as bactérias tendem a uma grande proliferação devido ao grande aumento das superfícies sólidas, agora presentes (ZoBell & Anderson, 1936). A taxa da respiração pelas bactérias pode alcançar às vezes até cerca de 0,2 mgO₂/l por dia. De acordo com experiências e considerações teóricas (Steemann-Nielsen, 1954) a fotossíntese na superfície das águas tropicais mais oligotróficas é da ordem de 0,03 mgO₂/l por dia. Nesta região teríamos, portanto, uma superestimativa (se usarmos o método do oxigênio) de cerca de 0,17 mgO₂/l por dia.

Esta conclusão só é absolutamente válida, entretanto, se considerarmos uma taxa de crescimento bacteriano maior em C_p do que em C_t , porque se o crescimento das bactérias for o mesmo em C_t e C_p , não teremos então introduzido erros sistemáticos.

Segundo Steemann-Nielsen (1952), grande parte do decréscimo de oxigênio no interior dos frascos pretos seria devido exclusivamente à respiração das bactérias, sendo de se notar que devido ao efeito bactericida da radiação solar, o consumo de oxigênio nos frascos transparentes seria menor do que nos frascos pretos. Este fato, se confirmado, implicaria na obtenção de valores superestimados na avaliação da fotossíntese total.

Experiências realizadas por Buchbinder et al. (1941), utilizando-se de várias linhagens de estreptococcus, demonstraram o efeito letal da radiação solar direta e indireta sobre as culturas. Miller & Schad (1944) trabalhando com meningococcus, observaram também o efeito bactericida da luz solar.

Entretanto, Vaccaro & Ryther (1954), Jones et al. (1958), Pratt & Berkson (1959) demonstraram que os efeitos da radiação solar ou dos antibióticos produzidos pelo fitoplâncton são insignificantes. Strickland & Parsons (1960) afirmam que havendo um "efeito" semelhante em C_t e C_p , não há introdução de erros sistemáticos.

Temos que levar em conta, entretanto, o seguinte fato: se há respiração adicional semelhante nos dois tipos de frascos (pretos e transparentes) a medida que obtivermos para a fotossíntese aparente será uma subestimativa da mesma ordem da respiração adicional devido ao "efeito dos frascos".

Pratt & Berkson (1959) baseados nas suas experiências, estimaram que as bactérias são responsáveis por 42,5 a 62,5% da respiração total, usualmente atribuída ao fitoplâncton (em experimentos de longa duração).

Concluimos, portanto, que todos os experimentos que sofrerem os "efeitos dos frascos" devem apresentar resultados errôneos para a respiração e para a fotossíntese aparente, enquanto que a fotossíntese total não é afetada.

Algumas experiências sobre o problema do efeito da respiração bacteriana no estudo da produção primária foram realizadas na região de Cananéia (Teixeira et al., 1965). As técnicas usadas nessas pesquisas possibilitaram o estudo da: 1º) - relação entre a variação sazonal e o efeito bactericida da radiação solar; 2º) - o balanço do oxigênio em condições naturais e durante a inibição do crescimento da flora bacteriana. Todas as experiências realizadas durante o inverno, caracterizaram-se por resultados negativos, quanto ao efeito letal da radiação solar sobre o crescimento das bactérias. As experiências realizadas durante o verão, entretanto, demonstraram enfaticamente o efeito bactericida da radiação solar sobre o crescimento das bactérias.

Embora relativa e indiretamente, ficou evidenciada a influência das bactérias na respiração da população natural. Nas diferentes etapas das experiências foi verificado, por comparação, que a taxa de consumo do oxigênio aumenta com o crescimento das bactérias e também a adição de estreptomina à água resultou num menor consumo de oxigênio (Fig. 3).

Baseados nos resultados dessas pesquisas, podemos concluir que a influência direta da radiação solar como agente bactericida não pode ser generalizada, pelo menos em se tratando de ambientes naturais (Tab. I).

TABELA I - Comparação relativa entre o crescimento das bactérias expostas à radiação solar (A) e no escuro (B). Ao maior número de bactérias/ml corresponde o valor 100% (seg. Teixeira et al., 1965).

Amostra nº	Tempo de exposição (h)	Maio - 1962		Novembro - 1953			
		A-1	B-1	A-2	B-2	A-3	B-3
1	2	4,00	6,00	2,80	11,00	0,40	8,40
2	3	4,20	4,80	0,30	11,50	0,23	8,90
3	5	7,50	6,70	0,29	4,50	0,11	3,20
4	7	5,00	8,00	0,85	9,00	0,21	1,00
5	14	7,50	9,00	0,88	0,68	6,80	-
6	24	80,00	38,50	4,30	100,00	0,73	47,00
7	35	65,00	100,00	4,60	79,00	2,00	52,00
8	44	100,00	75,00	1,20	84,00	0,68	31,00

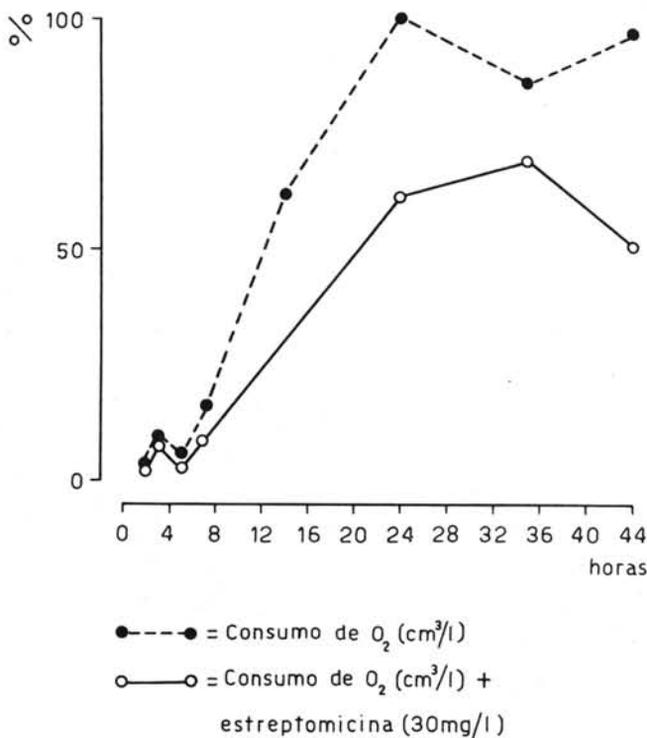


Fig. 3 - Gráfico mostrando o consumo relativo de oxigênio em populações naturais de plâncton em condições experimentais. Ao maior consumo de O₂ corresponde o valor de 100% (dados de Teixeira et al., 1965).

Em laboratório, trabalhando-se com culturas puras, parece não haver dúvida quanto ao efeito letal da radiação solar sobre o crescimento das bactérias (Buchbinder et al., 1941; Miller & Schad, 1944; Jørgensen & Steemann-Nielsen, 1960), mas estas condições são muito diversas das que realmente ocorreram na natureza. Deixa de existir, por exemplo: interação entre o fito e o zooplâncton de um lado e com as bactérias do outro; o substrato também é diferente, logo, também as interações bioquímicas e biofísicas devem ser diferentes.

Outro fator que deve ser levado em conta é a variação das condições ambientais através das diversas épocas do ano, pois, não são os fatores físicos e químicos apresentam diferenças quantitativas e qualitativas, como a própria composição das populações naturais dos organismos vivos varia. A própria população bacteriana apresenta diferenças consideráveis, quer sob o ponto de vista

específico, quer sob o fisiológico. As pesquisas realizadas em Cananéia, evidenciaram consideráveis diferenças quantitativas e qualitativas no que se refere às populações do plâncton e das bactérias nas diferentes épocas em que foram realizadas.

Provavelmente, além do efeito bactericida da radiação solar, outros fatores podem e devem intervir de maneira a reduzir ou a estimular as atividades bacterianas.

O próprio efeito bactericida da radiação solar deve variar através das diversas épocas do ano, e das diversas horas de um mesmo dia, pois, a distribuição da energia espectral da radiação solar está sujeita à variação causada pelo ângulo e altitude do sol e, também, pelas condições meteorológicas.

O problema parece ser de grande complexidade e merece que novas pesquisas sejam levadas a efeito, nas diversas épocas do ano, como também, nos mais diversos ambientes e nas diversas horas de um mesmo dia.

Resumo da técnica do oxigênio -

C_i = Concentração inicial de oxigênio antes da incubação.

C_t = Concentração de oxigênio na garrafa transparente depois da incubação.

C_p = Concentração de oxigênio na garrafa preta depois da incubação.

PRODUÇÃO TOTAL = oxigênio total produzido pela fotossíntese = $C_t - C_p$.

RESPIRAÇÃO = oxigênio total consumido pela respiração = $C_i - C_p$.

PRODUÇÃO APARENTE = produção total - respiração = $C_t - C_i$.

Significado da técnica do oxigênio - O limite da precisão do "método do oxigênio" depende naturalmente da sensibilidade da técnica de medir o oxigênio dissolvido, na maioria dos casos, a técnica de Winkler (com ou sem modificações), e da natureza das condições ambientais em que se estiver realizando as medidas.

Strickland & Parsons (1960), assumindo um PQ de 1,2 e uma precisão de 0,05, acha que o mínimo de fotossíntese que pode ser medida pelo "método do oxigênio" é cerca de 20 mgC/m³, com uma única titulação, ou cerca de 15 mgC/m³, usando-se duplicatas.

Um grande número de pesquisas realizadas com o "método do oxigênio" teve resultados não significantes com relação à produção primária, principalmente as realizadas em regiões caracterizadas por densidades de fitoplâncton com concentração de clorofila-*a* menor do que 1 mg/m³.

Rabinowitch (1945) utilizando-se destes dados para calcular a produção de matéria orgânica nos mares, obteve valores hoje considerados exorbitantes (numa ordem de 10 vezes). Rabinowitch (op. cit.) estimou que os vegetais existentes sobre a terra fixam anualmente $1,9 \times 10^{10}$ t. de carbono, enquanto os vegetais marinhos fixam $15,5 \times 10^{10}$ t. de carbono.

MÉTODO DO C^{14} - Steemann-Nielsen (1951, p. 684), chamou a atenção dos pesquisadores sobre a aplicação do C^{14} aos estudos da produtividade marinha, e em 1952 estabeleceu a técnica geral de bordo, que foi posteriormente mudada em certos aspectos por vários autores, sem contudo modificar a essência da técnica original.

Na técnica do C^{14} , a incorporação do traçador na matéria orgânica do fitoplâncton durante a fotossíntese é usada como uma medida da taxa da produção primária.

Conhecendo-se o conteúdo do CO_2 total da água experimental e adicionando-se uma quantidade definida de $^{14}CO_2$ na água, pode-se calcular o carbono assimilado pelo plâncton depois do experimento. Basta apenas multiplicar a quantidade do C^{14} encontrado, por um fator correspondente à razão entre o CO_2 total da água e o $^{14}CO_2$ total adicionado no início do experimento. Assim, temos:

$$\text{Produção} = \frac{\text{ipm (F. transp.)} - \text{ipm (F. preto)}}{\text{ipm adicionado}} \times \frac{1,05 \times \Sigma CO_2}{\text{tempo}}$$

A relativa simplicidade desta técnica e principalmente sua grande sensibilidade tornaram-na mundialmente utilizada para medir a produção primária no mar.

Técnica geral - Uma descrição detalhada da técnica do C^{14} empregada em medidas de produção primária pode ser encontrada em artigos dos seguintes autores: Steemann-Nielsen (1952); Doty (1955); King et al. (1957); Jitts et al. (1957); Steemann-Nielsen & Jensen (1957); Vollenweider (1969); Sestak et al. (1971).

Em linhas gerais, podemos considerar as seguintes fases na aplicação da técnica do C^{14} :

- a) - coleta do material;
- b) - inoculação com C^{14} ;
- c) - exposição à luz;
- d) - filtração;
- e) - remoção do C^{14} na forma inorgânica;
- f) - dessecação dos filtros;
- g) - medida da atividade dos filtros e cálculos.

a) - Coleta do material - O material deve ser coletado em aparelhos de coleta de plástico (Fig. 4) uma vez que os coletores de metal, poderiam interferir no processo de fixação do C^{14} , pela libertação de determinados íons. As coletas das amostras são feitas obedecendo-se a vários critérios, porém, usualmente a maioria dos pesquisadores baseia-se na penetração de luz dentro da camada eufótica, ou seja, desde a superfície (= 100%) até a uma profundidade onde a luz tenha sido atenuada para 1%. O volume de uma amostra deve ser suficiente para encher no mínimo 3 frascos experimentais e para se determinar alcalinidade e pH, contagem de plâncton, determinação de pigmentos, além de outros possíveis fatores adicionais.

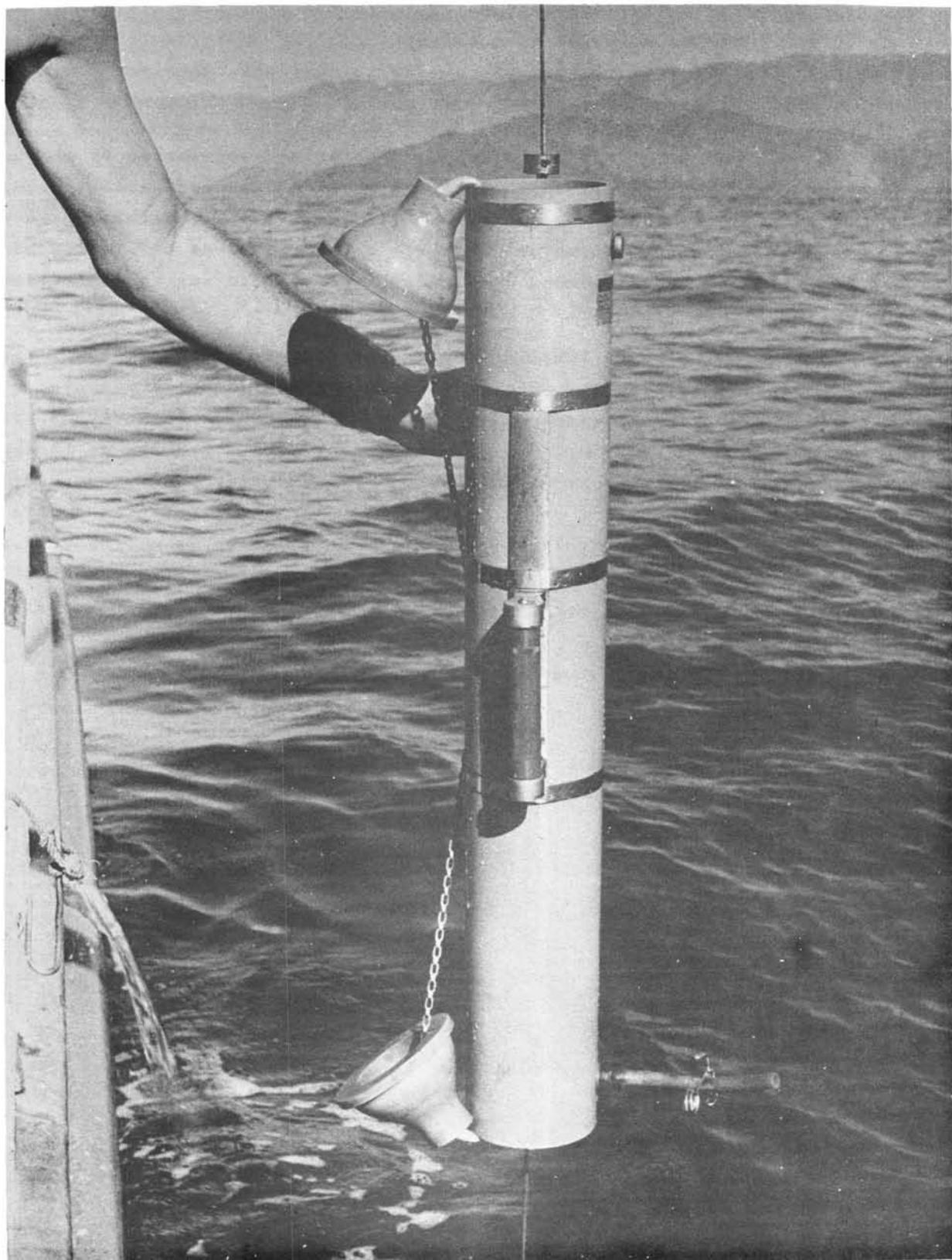


Fig. 4 - Coletor de amostras de plástico, tipo "garrafa de Van Dorn", pronto para imergir nas águas.

É recomendado coletar primeiro toda a água das amostras das várias profundidades e transferi-las imediatamente para os frascos experimentais, colocando-os no interior de uma caixa escura. A exposição de amostras coletadas na camada eufótica inferior a radiações de alta intensidade deve ser evitada, pois, poderia causar danos às mesmas.

b) Inoculação com C^{14} - Uma vez coletado o material inoculam-se os frascos com uma solução de $Na_2C^{14}O_3$. Devemos usar pipetas tipo "Pasteur" esterilizadas ou seringas de plástico esterilizadas (tipo "Plastipak") para evitar a fixação do C^{14} . Pela experiência, torna-se familiar a quantidade de C^{14} (atividade) que se deve adicionar aos frascos, de maneira que produza uma radioatividade moderada na amostra de plâncton.

A atividade resultante no final do experimento depende de numerosas variáveis, como por exemplo, a taxa de crescimento, a densidade do plâncton, a duração da incubação, a quantidade filtrada etc. Para águas de moderada produtividade, uma adição de 1-3 $\mu Ci/100$ ml de amostra, com 4-6 horas de incubação é suficiente. Para águas de baixa produtividade, uma adição de 10-20 $\mu Ci/100$ ml de amostra, com 6-8 horas de incubação também é suficiente para a obtenção de boas amostras. O volume da amostra de plâncton a ser usado deve ser determinado experimentalmente a fim de evitar a ocorrência do fenômeno da auto-absorção (Fig. 5). Uma vez inoculados, os frascos são levados para o oceano, à mesma profundidade de onde vieram, ou então, o que é mais viável, para tanques experimentais (método simulado).

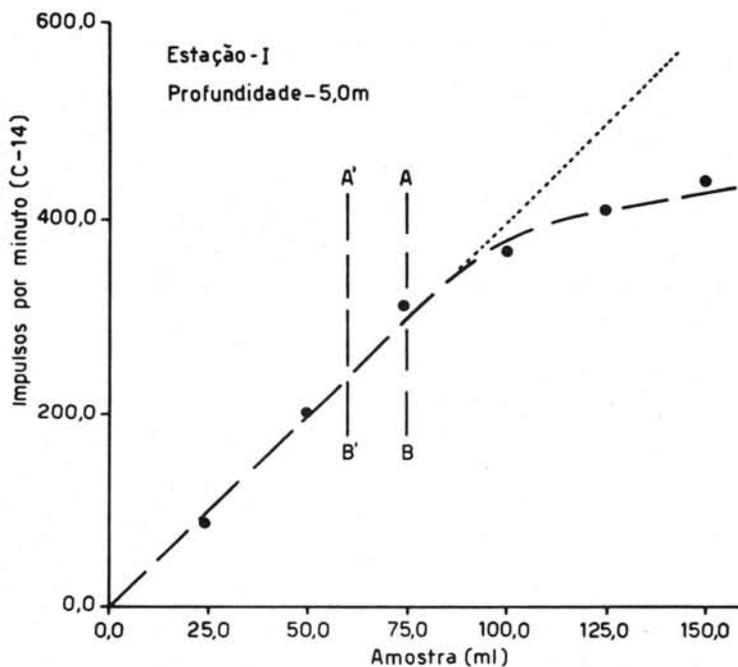


Fig. 5 - Gráfico mostrando a determinação experimental da ocorrência do fenômeno da auto-absorção em amostras de plâncton marcadas com C^{14} . A região A'A' - B'B', foi escolhida como volume ideal para ser utilizado como rotina em medidas de produção primária (segundo Teixeira, 1969).

c) Exposição à luz - O método mais usado para experimentos "*in situ*" é o da suspensão das amostras por um fio de nylon ou correntes, presos a um flutuador (Fig. 2). Sempre que possível, deve-se prender os frascos transparentes a suportes metálicos, o que além de proteger os frascos, permite uma melhor exposição dos mesmos à radiação solar (Fig. 6).

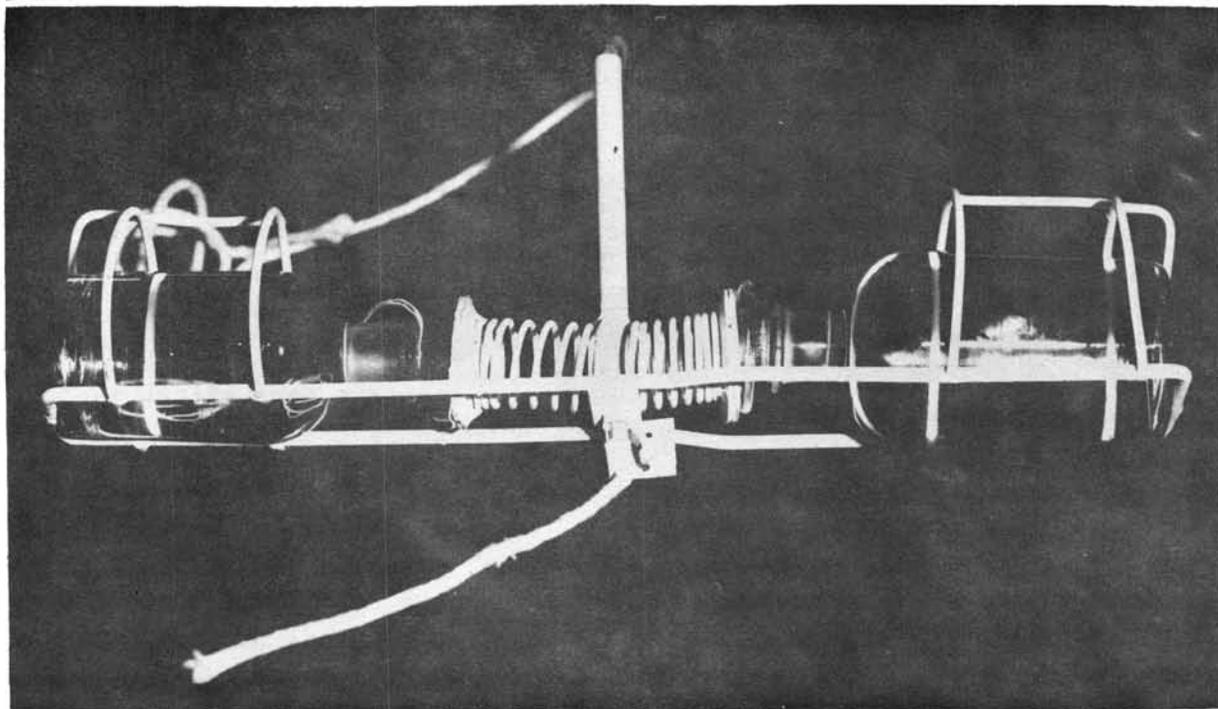


Fig. 6 - Fotografia mostrando um dos tipos de suporte para frascos experimentais utilizados para o processo da incubação "*in situ*" (segundo Phonlor, 1968).

Nos casos onde não há possibilidade do emprego do método "*in situ*", devem ser usados "tanques experimentais" com temperatura constante, semelhante à do local onde foram coletadas as amostras (Fig. 7). Procura-se reproduzir nos "tanques" o que acontece no oceano: as amostras são algumas vezes colocadas num disco que gira continuamente procurando dar uma certa agitação ao plâncton, como ocorre no mar. Para simular a atenuação da radiação solar pelas diferentes camadas de água, são usados filtros neutros que reduzem a quantidade de luz mas não a qualidade. Os filtros neutros podem ser construídos usando-se telas de nylon pintadas de preto com diferentes porosidades, ou, com superposição de diferentes camadas. Outro tipo de filtro neutro pode ser construído utilizando-se uma série de filmes Kodak (tipo Verickrome Pan 120-125 ASA, ou mesmo, filtros neutros Kodak, oferecidos comercialmente) expostos diferencialmente à luz e a seguir revelados. Escolhidos os melhores, os mesmos devem ser montados entre duas placas delgadas de vidro coladas com Araldite para evitar qualquer influência do meio exterior.

O tempo de duração da exposição à luz não deve exceder a 10 horas, preferencialmente entre 4-6 horas, para evitar a ocorrência de perdas de carbono marcado, fotossintetizado do interior das células para o meio (Strickland & Parsons, 1960; 1965).

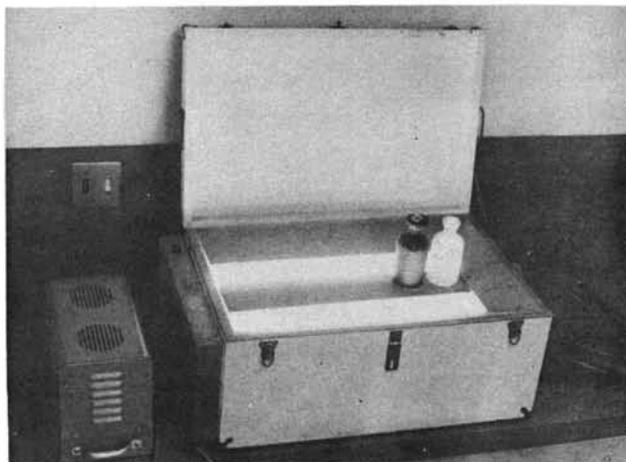


Fig. 7 - Fotografia de um incubador utilizado para o processo da exposição de amostras a uma fonte luminosa artificial (= incubação simulada). Além do incubador, vêem-se os dois tipos de frascos utilizados para as experiências.

d) Filtração - Terminado o tempo de exposição à luz, os frascos devem ser imediatamente recobertos com um plástico preto e opaco e em seguida, levados para o laboratório para a filtração das amostras o mais rápido possível, não se devendo adicionar formalina às amostras para evitar assimilação de C^{14} por meio da fotossíntese. Há evidência de que a formalina pode causar a destruição das células mais frágeis do fitoplâncton e por conseguinte a perda de material fotossintetizado (Tundisi & Teixeira, 1968) (Tab. II). As amostras devem ser filtradas em série, simultaneamente, observando-se sempre a mesma ordem com relação aos pares de cada intensidade, e o tempo para a filtração não deve exceder a 5 min.

TABELA II - O efeito da formalina sobre a fotossíntese (fixação com formalina a 4% preparada de acordo com Strickland & Parsons, 1965).

Tamanho das células (μ)	Amostras tratadas com formalina (ipm)	Amostras sem formalina (ipm)
25	2.612	4.116
25	2.368	3.994
50	3.544	4.574
50	3.880	5.126

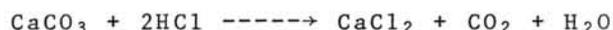
No final da filtração, os filtros devem sofrer sucção até secá-los totalmente a fim de evitar a formação de cristais de sais e, logo a seguir, guardados num dessecador.

Os filtros geralmente usados são do tipo "MF - Millipore" do tipo HA (com poros de diâmetro igual a $0,45 \mu$), e os filtradores (suportes para os filtros) podem ser construídos de plástico, de vidro, ou de metal, desde que plastificados internamente. Os filtros não devem ser submetidos a pressões maiores que 0,5 atmosfera, para evitar eventuais rupturas das células mais frágeis de organismos do fitoplâncton, com conseqüente perda de C^{14} (Tundisi & Teixeira, op. cit.) (Tab. III).

TABELA III - O efeito de diferentes pressões positivas sobre as células de tamanhos diferentes.

Pressão (kg/cm ²)	ipm (média de 2 réplicas)	Tamanho das células (μ)
1,0	307	50
	244	25
1,5	273	50
	322	25
2,0	282	50
	164	25

e) - Remoção de C^{14} na forma inorgânica - O C^{14} na forma inorgânica deve ser removido depois da filtração. Deve-se evitar a lavagem dos filtros com soluções fracas de ácido, pois as mesmas, podem causar perda de material marcado pela destruição de células frágeis. O melhor método para remoção do C^{14} sem provocar alterações sobre os organismos, é o de se colocar os filtros numa cuba fechada na presença de HCl concentrado, que se volatiliza e ataca o carbono de tal maneira, que todo o C^{14} na forma inorgânica é removido pela perda do CO_2 , assim:



f) - Dessecamento dos filtros - Como o $CaCl_2$ formado absorve água, colocam-se os filtros num dessecador, retirando-se apenas no momento em que serão levados para contar a radioatividade dos mesmos.

g) - Medida da atividade dos filtros e cálculos - Para poder calcular a quantidade de C^{14} assimilado pelas algas durante qualquer experimento, é fundamental que se conheça a atividade das soluções empregadas, medidas em impulsos por minuto, com relação aos equipamentos de cada laboratório. Na maioria dos laboratórios usa-se fazer apenas uma determinação relativa da atividade,

pois a determinação da atividade absoluta necessita de equipamento e pessoal altamente especializado no assunto (o que não é o caso da maioria dos oceanógrafos-biologistas). Mesmo para se determinar a atividade relativa, exigem-se cuidados e técnicas especiais, sobretudo quando se trata de C^{14} que é um radio-isótopo de baixa energia ($E = 0,156$ Mev), sendo necessário fazer-se a correção dos resultados das contagens devido a absorção das partículas no interior da própria amostra (Franca, 1961).

Vários métodos têm sido usados para converter o C^{14} , componente do material solúvel, como o carbonato de sódio, para material insolúvel, como o carbonato de bário. Estes métodos tendem a ser restringidos apenas para pesquisas que tenham como escopo medidas relativas, pois, para medidas absolutas pode-se incorrer em erros até 30% (Vollenweider, 1969).

O método a ser descrito, foi desenvolvido por Steemann-Nielsen (1952), com algumas modificações por nós introduzidas na parte experimental, baseados no método adotado por Doty & Oguri (1959).

Procedimentos radioquímicos - A preparação das amostras radioativas sólidas é obtida por espalhamento uniforme de suspensões de material insolúvel, no caso o carbonato de bário, obedecendo as seguintes fases: uma subamostra da solução radioativa (parte de uma ampola) é diluída e adicionado $NaCO_3$ como carreador; adicionando-se em seguida $BaCl_2$, resulta um precipitado que é imediatamente transferido para filtros "Millipore" (tipo HA-branco de 25 mm de diâmetro) previamente pesados numa balança (por exemplo, Sartorius tipo 2462). As radiações emitidas pelo nuclídeo carbono-14, podem ser determinadas por meio de um detector "Geiger-Müller" de janela terminal de mica, ou de um "gas-flow" (sem janela).

Para corrigir a auto-absorção, devem ser construídas algumas curvas baseadas nos resultados obtidos pela preparação de uma série de amostras com espessuras diferentes. Estas amostras são obtidas pela adição de diferentes quantidades do carreador para um mesmo volume de solução radioativa. Para se obter a curva, basta colocar a contagem observada como função do peso do precipitado por unidade de área.

Esta curva de correção pode ser utilizada para converter a contagem observada para uma contagem "sem peso". Para calcular a atividade da solução radioativa original em número de impulsos por ml a uma espessura "sem peso", basta conhecer o volume da amostra original e a diluição realizada inicialmente. A determinação gráfica se faz por meio de uma extrapolação.

Detalhes técnicos -

Medidas da atividade específica da ampola do C^{14} :

- i. 0,004 mol de $NaHCO_3$;
- ii. 0,02 mol de Na_2CO_3 ;
- iii. uma ampola diluída com a solução até completar 25,0 ml;
- iv. 2 moles de $NaOH$ mais 1 mol de NH_4NO_3 ;
- v. 0,5 mol de $BaCl_2$.

Num frasco graduado de 100 ml devem ser pipetados, na seguinte ordem:

- 1º) 50,0 ml da solução nº ii;
- 2º) 1,0 ml da solução nº iii;
- 3º) 2,4 ml da solução nº iv;
- 4º) 4,0 ml da solução nº v, agitando-se a seguir lentamente;
- 5º) Água destilada até totalizar 100 ml.

Esta suspensão deve ser filtrada sobre filtros "Millipore" (tipo HA-branco - 25 mm) e não em filtros de papel tipo SS-589, utilizados principalmente pela "Agência Internacional para medidas de carbono-14". Antes de se operar o processo da filtração, um determinado número de filtros "Millipore" deve ser colocado num dessecador com sílica-gel e vácuo, durante 24 horas para evitar o máximo de hidratação, sendo então pesados com uma precisão de 0,1 mg.

A filtração deve ser realizada por meio de sucção, obedecendo a seguinte ordem:

- a) o frasco é fortemente agitado com o precipitado de BaCO_3 ;
- b) retira-se 10,0 ml do conteúdo que é colocado no filtrador* sobre o filtro "Millipore" (tendo-se o cuidado de lavar as paredes do funil do filtrado com água destilada, de maneira que não se altere a superfície da área filtrada;
- c) o filtro mais o precipitado devem ser colocados num dessecador por 24 horas, pesados novamente, realizando-se a seguir a contagem. Esta deve ser feita com uma precisão de 1% (10.000 impulsos).

Devem ser preparadas 5 amostras para cada ampola, sempre de maneira idêntica. Alguns filtros, nos quais é adicionada apenas água destilada, servirão como controle para se aferir quaisquer mudanças devidas aos próprios filtros.

Para cada filtro pesa-se o BaCO_3 filtrado, como $\text{mgBaCO}_3/\text{cm}^2$ e a atividade como impulsos/min subtraindo-se a radiação de fundo e padronizando-se as amostras. A auto-absorção para a quantidade de $\text{BaCO}_3/\text{cm}^2$ em questão, é corrigida através da curva de auto-absorção; para que os valores obtidos por este método sejam equivalentes ao método biológico, deve-se subtrair do resultado (ipm/ampola) um valor igual a 31% (Stemann-Nielsen, 1965).

Determinação da curva de auto-absorção (Fig. 8).

São empregadas as seguintes soluções:

- i. 0,1 mol de NaOH + 0,1 mol de NH_4NO_3 ;
- ii. 0,05 mol de Na_2CO_3 ;
- iii. uma ampola diluída com água destilada até completar 100,0 ml;
- iv. 0,1 mol de BaCl_2 .

* - a fim de diminuir os fenômenos de adesão do carbonato às paredes dos suportes dos filtros, deve-se passar uma camada bem fina de silicone nos mesmos.

Em 7 tubos de ensaio devem ser pipetadas as soluções (i-iv), em ordem consecutiva, a fim de precipitar o BaCO_3 , pelo aumento do peso total, mantendo-se entretanto, a atividade específica (ver Tab. IV).

TABELA IV

Tubos de ensaio	i (ml)	ii (ml)	iii (ml)	iv (ml)
1	10	0,1	0,5	2,0
2	10	0,3	0,5	2,0
3	10	0,5	0,5	2,0
4	10	0,7	0,5	2,0
5	10	1,0	0,5	2,0
6	10	2,0	0,5	4,0
7	10	3,0	0,5	4,0

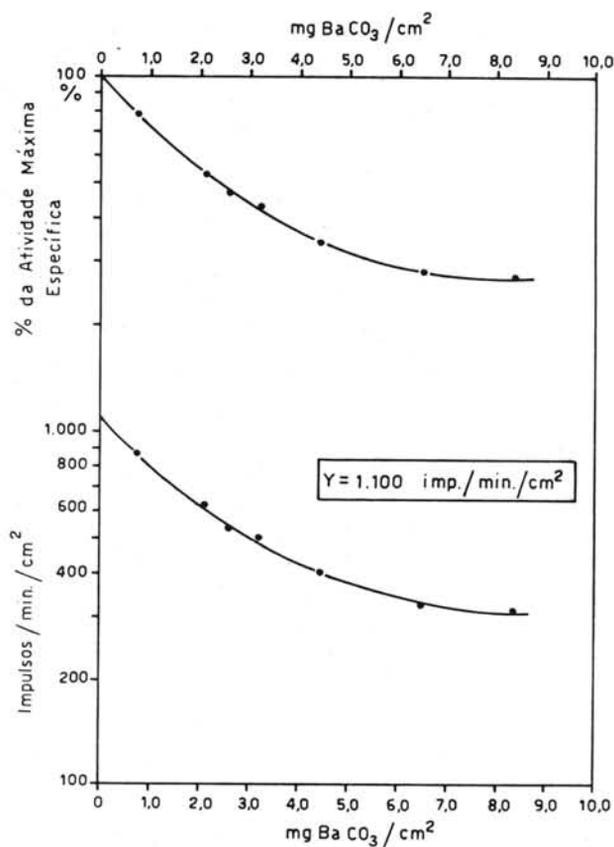


Fig. 8 - Curva da auto-absorção para a determinação da atividade específica do C^{14} .

Precipitação química do C^{14} na forma de $\text{BaC}^{14}\text{O}_2$ (em meio alcalino):



As pequenas quantidades da solução ii são medidas por meio de uma microbureta tipo "monostat". A solução iv deve ser pipetada vagarosamente, seguida de agitação. Os filtros "Millipore" assim como o processo da filtração e a contagem da atividade de cada amostra, devem receber idênticos cuidados aos descritos no experimento anterior.

Com os dados obtidos constrói-se uma curva em papel "semilog" com $\text{mgBaCO}_3/\text{m}^2$ na abscissa e impulsos por min menos a radiação de fundo/ cm^2 na ordenada. Esta curva será extrapolada para 0 $\text{mgBaCO}_3/\text{m}^2$ (Y), e a ordenada na curva será computada em porcentagem de Y. Estas porcentagens serão colocadas em gráficos num papel "semilog", construindo-se uma outra curva, com porcentagens e $\text{mgBaCO}_3/\text{m}^2$ na abscissa. Esta curva será utilizada para a correção dos dados referentes à determinação da atividade específica das ampolas (Fig. 8).

Cálculos relativos à determinação da produção primária por meio do C^{14} - As medidas da produção primária podem ser calculadas empregando-se a seguinte equação:

$$P = \frac{\text{atividade aparente (I)}}{\text{atividade disponível (II)}} \times \frac{\text{concentração do } CO_2 \text{ total (III)}}{\text{período de incubação}} \times K_{1,2}$$

ou,

$$mgC/h/m^3 = \frac{\text{ipm da amostra}}{\text{ipm disponível}} \times \frac{1}{\text{tempo de incubação}} \times \frac{CO_2}{1} \times \frac{12}{44} \times K_{1,2} \quad (IV)$$

ou simplificando-se, temos:

$$\frac{F_t - F_p}{\text{horas de incubação}} \times K = mgC/h/m^3$$

- (I) = C^{14} assimilado = (número total de impulsos) - (radiação de fundo) $\times 1,06^*$;
 (II) = C^{14} disponível = C^{14} adicionado (pode ser expresso como atividade relativa à amostra "sem peso" se apenas medidas relativas são tomadas em conta, ou como μ Currie \times eficiência do contador segundo uma determinada geometria);
 (III) = C^{12} disponível = alcalinidade total \times pH $\times 12 = mg^{12}C/l$ ou $\times \frac{CO_2}{1} \times \frac{12}{44}$;
 (IV) = K_1 correção para o fator relativo ao volume da amostra; ex.: se 100 ml foram filtrados de um frasco experimental de 250 ml, e 1,0 ml de solução contendo C^{14} foi adicionado, o fator será igual a $249/100 = 2,49$;
 K_2 fator dimensional, para converter por exemplo, de mg/l para mg/m^3 , ou mg/m^2 .

Discussão sobre a interpretação das medidas de produção do fitoplâncton pelo método do C^{14} - Um dos pontos mais discutidos com respeito à técnica do carbono-14, é quanto ao problema se a mesma mede a produção aparente ou a produção total.

Ryther (1956) afirma que a técnica do carbono-14 mede a produção aparente, enquanto que Steemann-Nielsen & Jensen (1957) afirmam que com apenas a introdução de algumas correções, a técnica do C^{14} mede a produção total.

Em princípio, a fotossíntese real poderá ser medida pelo método do carbono-14, apenas nas seguintes condições:

- quando a taxa de assimilação do C^{14} for exatamente igual à do C^{12} ;
- quando todo C^{14} for incorporado somente pelo processo da fotossíntese;
- nenhum C^{14} assimilado deve ser perdido por meio da excreção ou da autólise durante a incubação, ou pela ruptura das células durante a filtração;
- nenhum C^{14} assimilado deve ser perdido pelas interrelações da fotossíntese com a respiração.

* - fator relativo às correções devidas a: fixação no escuro + respiração + discriminação isotópica.

Na prática, nenhuma destas condições é completamente satisfeita, e para que se possa calcular a fotossíntese total, os dados naturalmente obtidos, devem ser corrigidos.

Correções para os dados do carbono-14 -

O efeito do isótopo - Teoricamente, devido ao maior peso molecular do $C^{14}O_2$, cerca de 4,5% mais pesado do que o $C^{12}O_2$, a assimilação do $C^{14}O_2$ deve ser proporcionalmente mais lenta do que a do $C^{12}O_2$.

Steemann-Nielsen (1952) usou um valor igual a 6,0% para a correção do efeito isotópico.

Mais recentemente, Buchanan et al. (1953) e Sorokin (1960), comparando as atividades específicas (ipm/concentração de carbono) em células de *Scenedesmus* com as atividades específicas do meio, seguindo por várias semanas o crescimento no meio marcado, chegaram à conclusão de que a atividade específica das algas foi 6,5% menor do que a do meio. Atualmente, considera-se razoável admitir-se um valor de 5% para a discriminação isotópica.

Assimilação do carbono-14 por processos não fotossintéticos - Durante a incubação das algas com o C^{14} , uma certa quantidade de C^{14} será assimilada por outros processos independentes da fotossíntese.

Steemann-Nielsen (1952) subtraía 1% da radioatividade encontrada no fitoplâncton em luz de saturação, para corrigir a assimilação não fotossintética. Em culturas de algas puras e em bom estado fisiológico, a fixação no escuro é cerca de 1% (Brown et al., 1949); entretanto, sob condições de extrema deficiência de nitrogênio, a assimilação no escuro, em culturas, pode alcançar até 37% das culturas iluminadas (nos frascos) (Steemann-Nielsen & Kholy, 1956).

Em populações naturais a fixação no escuro pode ser maior, chegando a valores de 9% da assimilação na luz, quando nas camadas superficiais e até acima de 30% para as amostras de águas profundas.

Em vista destas variações, é aconselhável sempre fazer-se a correção baseada em valores experimentais e não aplicar uma correção padrão.

Quanto ao efeito do "dark fixation", foram realizadas várias medidas em populações naturais por Teixeira, Tundisi e colaboradores (1965-1970), das quais podemos apresentar alguns dados encontrados em águas costeiras, mar alto e também em regiões estuarinas e lagunares (Tab. V). Estudos mais recentes sobre a matéria foram realizados por Morris et al. (1971).

A fixação do CO_2 no escuro, dá-se principalmente pela incorporação do CO_2 nos grupos carboxila durante a respiração e a fermentação (constituintes intermediários).

Há incorporação do CO_2 nos grupos carboxílicos; vemos, portanto, que o

Perdas de carbono-14 por excreção e devido à ruptura das células durante a filtração - Do C^{14} assimilado durante a incubação e convertido em matéria orgânica marcada, alguma porção desta pode ser excretada para o exterior da célula.

Similarmente, se uma célula contiver matéria orgânica marcada e a mesma morrer ou sofrer uma ruptura durante a incubação, ou a filtração, parte da radioatividade será perdida. O método do carbono-14 subestimarà a fotossíntese total segundo um valor igual à radioatividade perdida no caso citado.

Embora a maioria dos pesquisadores não leve em conta este efeito, recentemente Allen (1956) e Guillard & Wangersky (1958), demonstraram que quantidades apreciáveis de carbono podem ser excretadas pelas algas.

Usando o C^{14} , Fogg (1958) mediu a excreção e a fotossíntese em populações naturais de dois lagos da Suécia. Depois da incubação com o C^{14} *in situ* e da filtração, ele removeu o excesso de carbono radioativo ($C^{14}O_2$) do filtrado. O resíduo foi extraído com etanol e a seguir testado quanto à radioatividade. Em todas as amostras, alguma radioatividade foi encontrada no extrato. Fogg (op. cit.) expressou esta atividade do filtrado, como uma fração daquele retido pelo filtro. Em amostras de superfície de um lago eutrófico, a atividade excretada foi somente de 2% do retido no filtro, enquanto que, a 10 m, houve um aumento para 8 e 21% no frasco preto que serviu como controle.

Em regiões oligotróficas foram sempre encontrados valores um pouco maiores.

Estes resultados mostram que a excreção pode ser afetada pela intensidade luminosa, uma vez que ela aumenta com a profundidade, e também devido a deficiência de nutrientes, verificada nos ambientes oligotróficos. Com relação aos efeitos da deficiência, Guillard & Wangersky (1958) encontraram quantidades máximas de carboidratos extracelulares, em culturas velhas de flagelados marinhos.

Similarmente, radioatividade excretada (que passa através dos filtros "Millipore") foi encontrada em culturas velhas de *Dunaliella primolecta*, mas não em culturas jovens (Lasker & Holmes, 1957).

Perdas de carbono-14 no processo respiratório - A aplicação de um fator de correção para a respiração que ocorre juntamente com a fotossíntese, é bastante incerta. Esta correção é dependente da taxa de respiração com relação à fotossíntese total. Para algas em boas condições fisiológicas, incubadas em altas intensidades luminosas, a respiração é cerca de 10% da fotossíntese. Como a intensidade diminui abaixo da saturação, a razão da fotossíntese para a respiração também diminui. A relação F/R também decresce, assim que as células se tornam deficientes em nutrientes.

Em populações marinhas naturais, a respiração foi de 15% ou menos da taxa de fotossíntese no seu ponto de saturação, em 90% das 78 determinações feitas por Steemann-Nielsen & Hansen (1959), nas águas da Groenlândia.

É possível que, na natureza, a respiração raramente exceda a 50% da fotossíntese, desde que, se considerarmos a presença de 12 horas com iluminação, a fotossíntese deve ser o dobro da respiração para equilibrar a perda do carbono pelas algas durante a noite. De outra maneira, as populações do fitoplâncton não persistiriam (Stemann-Nielsen & Kholy, 1956; Strickland & Parsons, 1960).

Outro fator que deve ser tomado em consideração para a correção da respiração, é a interrelação entre fotossíntese e respiração (Rabinowitch (1956) estuda este assunto).

A natureza das interrelações fotossíntese-respiração (seja a inibição da respiração, reutilização do CO_2 respirado etc.) é de interesse para o fisiologista; o ecologista que trabalha em produtividade com o método do C^{14} necessita apenas saber a magnitude da correção que deve aplicar para determinar a fotossíntese total.

Stemann-Nielsen (1955a) e Ryther (1956) realizaram algumas pesquisas aplicáveis a este processo. As perdas de C^{14} de algas previamente marcadas foram medidas na luz e no escuro. Steemann-Nielsen (op. cit.) marcou *Chlorella* por 1 h e por 30 min, e transferiu as células para um meio não radioativo. Durante períodos de incubação superior a 7 horas ele encontrou uma quantidade de carbono marcado libertado na luz, apenas de 30 a 40% daquele libertado no escuro. Ryther (op. cit.) trabalhou com *Dunaliella* por vários dias num meio contendo C^{14} . Transferiu depois para um meio não radioativo e incubou, a seguir, na luz e no escuro por 24 horas. Nas iluminadas não houve libertação de C^{14} das células. Estudos mais recentes realizados com o espectrômetro de massa e isótopos de carbono confirmaram os resultados obtidos por Steemann-Nielsen (op. cit.), isto é, que a libertação de CO_2 não é completamente inibida pela luz. Brown & Weis (1959) mostraram que a produção de CO_2 por *Ankistrodesmus* foi inibida cerca de 50% pela luz, e que esta inibição era independente da intensidade luminosa. Resultados similares foram obtidos usando-se culturas de *Ochromonas* (Weis & Brown, 1959).

Se nenhum C^{14}O_2 (da respiração) for perdido, isto é, for reutilizado na fotossíntese, o método medirá a fotossíntese aparente.

Se apenas uma parte do CO_2 (da respiração) for reutilizado, o método medirá um valor equivalente entre a fotossíntese total e a aparente. Em experimentos realizados com culturas de *Dunaliella* (culturas jovens e velhas), Teixeira, 1969 (dados não publicados), chegou às seguintes conclusões: em culturas jovens encontrou 21% do CO_2 libertado no escuro e em culturas na fase estacionária, 37% (Fig. 9).

Experimento - A (cultura jovem) ----- 2 h em C^{14}
 Experimento - B (cultura velha) ----- 2 h em C^{14} (I)

(II) TRANSFERIDAS PARA MEIO NÃO RADIOATIVO → 6 h ----- A = 21% CO_2 libertado no escuro
 ----- B = 37% CO_2 libertado no escuro

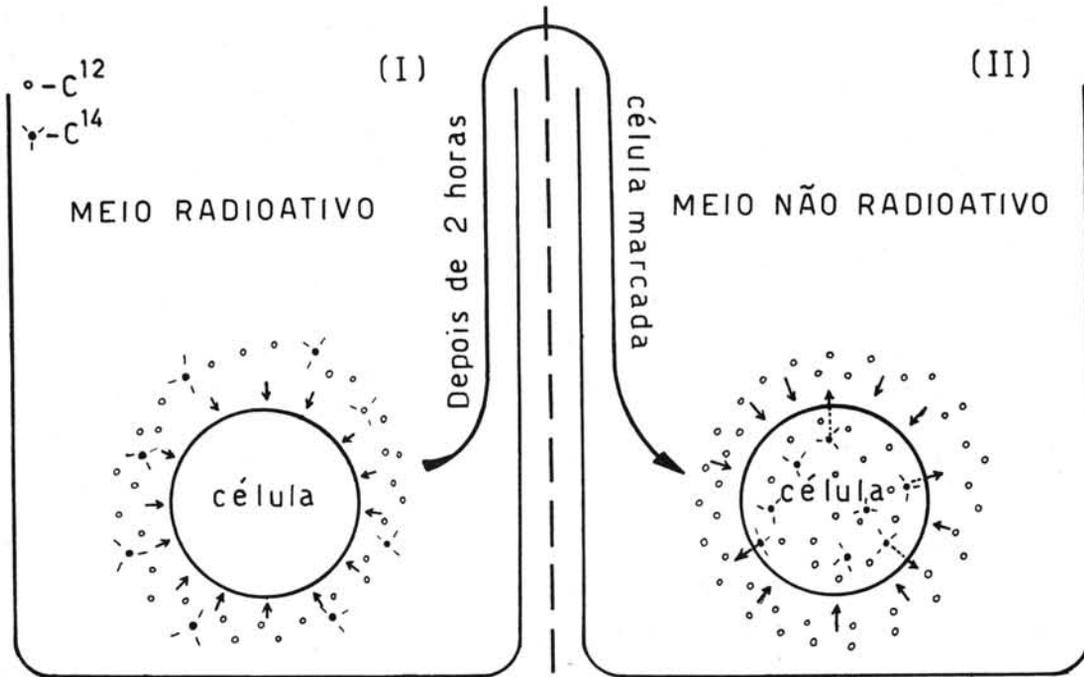


Fig. 9 - Experiência realizada em *Dunaliella* sp. Partes (I) e (II).

O aspecto crucial da correção para a respiração é a relação F/R; os processos da interrelação entre fotossíntese e respiração são de menor importância.

Na Tabela seguinte temos um exemplo em que dois conjuntos de fatores de correção para respiração podem ser utilizados, para obter-se valores para a fotossíntese total.

Um dos conjuntos de fatores é calculado considerando-se uma completa foto-inibição da liberação do $C^{14}O_2$ (da respiração) (Ryther, 1956). O outro conjunto é calculado considerando-se 60% da foto-inibição (Steemann-Nielsen, 1955a). Devemos notar que a diferença entre os dois fatores é excessiva somente quando F/R for menor do que 2.

F/R	100% de foto-inibição (seg. Ryther, 1956)	60% de foto-inibição (seg. Steemann-Nielsen, 1955a)
20,0	1,05	1,03
10,0	1,10	1,06
5,0	1,20	1,12
3,0	1,33	1,20
2,0	1,50	1,30
1,5	1,67	1,40
1,0	2,00	1,60

Resumo das conclusões sobre o significado dos métodos do oxigênio e do carbono-14 - O processo da fotossíntese consiste de um complexo de reações de natureza fotoquímica e química, que nem sempre apresentam interrelações fixadas entre si. Baseados nestes fundamentos podemos deduzir que os métodos do "oxigênio" e do "carbono-14" ao medirem a taxa das diferentes reações, poderão produzir resultados discordantes.

A mudança na concentração do oxigênio que ocorre em uma amostra de água, é resultante da produção de oxigênio através do processo da fotólise da água que ocorre nos organismos clorofilados, e o consumo de oxigênio na respiração pelos organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes. A quantidade de oxigênio produzida em contato com a luz é, portanto, uma medida da fotossíntese aparente quando se tratar de uma cultura pura de algas clorofiladas, ou será uma medida da fotossíntese aparente de uma comunidade quando se tratar de uma população natural. Em experiências de curta duração, a quantidade de oxigênio consumida num frasco paralelo preto, pode ser adicionada à quantidade produzida no frasco transparente para dar uma estimativa da fotossíntese total. Isto, supondo-se naturalmente, que a taxa da respiração permaneça a mesma nos dois tipos de frascos experimentais. Porém, isso nem sempre é correto, quando se trata de amostras de populações naturais (Steemann-Nielsen, 1952; Teixeira et al., 1965). A fotossíntese total, determinada pelo método do "oxigênio", é uma medida da taxa da conversão da energia radiante para energia química potencial num ecossistema, quando se aplica o método com determinados cuidados e em ambientes não poluídos, com potencial de produção relativamente alto. Temos, entretanto, que levar em conta, determinados casos em que se pode dar esta conversão, através da fotofosforilação cíclica sem que ocorra liberação de oxigênio (Arnon et al., 1958) e também, a fotossíntese, devido às bactérias que não envolvem o processo da fotólise da água, processo esse quantitativamente pouco significante em águas oxigenadas.

Quando se emprega o método do C^{14} , o mesmo é suprido como bicarbonato, que ao ser assimilado pelos organismos poderá integrar-se em vários tipos de reações, nem todas ligadas ao processo da fotossíntese.

Se o carbonato de cálcio for acumulado, como por exemplo, nas carapaças das *Coccolithophoridae*, pode-se eliminar o mesmo, através de uma exposição da amostra aos vapores de ácido clorídrico concentrado, restando apenas a radioatividade residual que representa a fixação na matéria orgânica. O processo da fixação na matéria orgânica pode ser devido às reações de carboxilação no "escuro", envolvendo escassamente qualquer ganho de energia química potencial, ou pode estar associado com grande acúmulo de energia química potencial em compostos orgânicos, resultantes da fotossíntese ou da quimiossíntese.

As reações de carboxilação no "escuro" são especialmente ativas em populações constituídas por organismos em más condições fisiológicas.

Outro problema que deve ser também considerado, é que a mesma quantidade de C^{14} fixado fotossinteticamente, pode apresentar diferentes ganhos em ener-

gia química potencial, de acordo com o produto sintetizado, como por exemplo carboidratos, proteínas ou gorduras, e isto dependerá das condições fisiológicas das algas e da viabilidade de nutrientes.

A interação entre o processo da respiração e da fotossíntese é bastante complexa, pois os produtos da fotossíntese podem ser usados preferencialmente durante a respiração e em experimentos com duração superior a 24 horas, a perda de C^{14} fixado através da respiração pode ser apreciável (Vollenweider & Nauwerck, 1961). Baseando-se nos fatos já discutidos, conclui-se ser muito difícil dizer com certeza se o método do C^{14} mede a fotossíntese aparente ou total, ou mesmo, o intermediário entre as duas. A fixação do C^{14} a partir do bicarbonato pode não dar uma verdadeira medida da fixação do carbono total, se também ocorrer a assimilação de compostos orgânicos concomitantemente. Há uma grande evidência de que a foto-assimilação dos compostos orgânicos pelas algas pode algumas vezes ser apreciável (Wright, 1964; Wiessner & Gaffron, 1964; Sen & Fogg, 1966). A fosforilação e a fixação fotossintéticas do nitrogênio dão como resultado um aumento da energia química potencial, sem necessariamente nenhuma fixação concomitante de carbono, mas os efeitos não são geralmente muito grandes.

Finalmente, devemos atentar para o fato de que na técnica convencional, a mesma atem-se em determinar apenas o radiocarbono fixado nos organismos retidos pelo filtro "Millipore", portanto, somente a fixação na matéria particulada é medida, logo a fotossíntese total será logicamente subestimada segundo a mesma quantidade dos produtos solúveis da fotossíntese libertados das células.

Comparações feitas entre os métodos do oxigênio e do C^{14} quando se utilizam culturas em laboratório ou com amostras concentradas de fitoplâncton natural, usualmente mostram grande concordância com um quociente fotossintético ($P.Q. = \Delta O_2 / -\Delta CO_2$) ligeiramente maior do que a unidade. O quociente fotossintético pode variar de 1, quando os carboidratos são os principais produtos, até um valor igual a 3,0, quando os lipídeos estão sendo sintetizados [o quociente respiratório ($R.Q. = \Delta CO_2 / -\Delta O_2$) é igual à unidade, quando os carboidratos são respirados e menor do que a unidade, isto é, cerca de 0,7 quando as gorduras são respiradas].

Entretanto, pode haver grandes discrepâncias entre os resultados dos métodos do oxigênio e do C^{14} , principalmente quando as células forem expostas a altas intensidades luminosas, ou então, em populações naturais não concentradas (Antia et al., 1963). Tem sido indicado que estas discrepâncias surgem principalmente devido a fixação do C^{14} através das reações da carboxilação e da libertação dos produtos extracelulares da fotossíntese (Fogg, 1963).

De um modo geral, está estabelecido que o método do C^{14} é bem mais sensível do que o método do oxigênio, e é o único que pode ser empregado satisfatoriamente em águas de natureza oligotrófica.

APÊNDICE

Com a finalidade de complementar os estudos sobre a produtividade primária, inserimos como um apêndice a descrição de uma técnica que possibilita ao pesquisador obter uma visão geral do fitoplâncton, sob o ponto de vista quantitativo. Por ser a mais precisa, e relativamente simples, é universalmente aceita a determinação da clorofila-*a*, como sendo o melhor meio de se avaliar quantitativamente o material fotossintetizante do fitoplâncton. Dos vários métodos existentes, escolhemos o de maior viabilidade para o nosso meio, dentre os métodos de maior precisão.

DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PIGMENTOS POR ESPECTROFOTOMETRIA - A técnica aqui apresentada, segue as recomendações de Creitz & Richards (1955), com a introdução de algumas modificações feitas por Strickland & Parsons (1965).

Em substituição ao método de Richards & Thompson (1952), é mais usado atualmente, para separar-se os organismos da água, o método de filtração por meio das membranas do tipo "Millipore", ou mais recentemente, com o filtro de lã de vidro (Whatman: GF/C).

Preparação da amostra:

1º) Toma-se uma certa quantidade de amostra (de 0,5 a 5,0 l, conforme a natureza da água), adicionando-se 1,0 ml de uma suspensão de carbonato de magnésio, de preferência nos últimos 100 ml de amostra que estiver sendo filtrada.

A adição do carbonato é para evitar a acidificação da clorofila, evitando desta maneira a sua transformação em feofitina.

2º) Após a filtração, remove-se a membrana do suporte e, com cuidado, recorta-se o filtro ao redor da área útil de filtração, diminuindo desta maneira o "branco". Quando se usa o filtro de vidro, praticamente não aparece o problema do "branco", além de ser menos dispendioso.

3º) Dobra-se cuidadosamente a membrana, colocando-a imediatamente no interior de um tubo graduado de centrífuga de 15,0 ml. Se usar "M.F.", adicionar aproximadamente 8,0 ml de acetona a 90%; fechar o tubo e agitar fortemente para dissolver a membrana. Quando usar o filtro de vidro, adicionar 10,0 ml de acetona a 90% e agitar vigorosamente. Introduzir o tubo (recoberto com papel preto), num dessecador com vácuo e colocar num "freezer" por cerca de 20 horas. Durante o período de extração, os pigmentos são muito fotossensíveis, daí os cuidados em se evitar qualquer exposição à luz direta.

4º) Remover o tubo do "freezer", deixá-los em repouso até adquirir a temperatura ambiente, e adicionar acetona a 90%, até completar 10,0 ml por "M.F." e 12,0 ml por filtro de vidro. Centrifugar o conteúdo durante 5-10 min com 3.000-4.000 rpm.

59) Decantar a camada superficial do líquido em uma cuba espectrofotométrica de 10 cm de extensão ("path length"), com capacidade de 10,0 ml de líquido, ou menos. Se empregar 12,0 ml de acetona com o filtro de vidro, multiplique a extinção do valor por 1,2, a fim de normalizá-lo aos valores esperados de 10,0 ml de extrato.

69) Sem demora, medir a extinção da solução, usando os seguintes comprimentos de onda: 665, 645, 630 e 480 mμ e 510 mμ, caso sejam aplicadas as equações de Richards para os carotenóides. Em adição aos comprimentos de onda utilizados, uma leitura deve ser feita em 750 mμ e este valor subtraído das densidades ópticas em 665, 645 e 630 mμ. O uso da d.o. 750 mμ serve para corrigir os erros devido a turbidez da água. Esta correção pode eliminar erros acima de 50%, quando se empregam cubas de 10,0 cm e valores baixos de d.o.

Para determinar a concentração das clorofilas numa amostra de 1 l de volume (v) usando-se extratos de acetona com volume de alguns ml (v), usamos a seguinte equação:

$$\text{mg clorofila} \frac{(a,b, \text{ ou } c)}{m^3} = \frac{C (a,b,c) \times v}{l \times V}$$

onde:

$$\text{mg pigmento}/m^3 = \frac{C}{V}$$

C, é o valor obtido das seguintes equações:

R = Richards;
 P.S. = Parsons & Strickland;
 H.J. = Humphrey & Jeffrey;
 E = valores de extinção nos comprimentos de onda indicados, medidos em uma cuba de 10 cm.

R. C (clorofila-a) = 15,6 E₆₆₅ - 2,0 E₆₄₅ - 0,8 E₆₃₀
 P.S. C (clorofila-a) = 11,6 E₆₆₅ - 1,31 E₆₄₅ - 0,14 E₆₃₀
 H.J. C (clorofila-a) = 13,7 E₆₆₅ - 2,16 E₆₄₅ - 0,19 E₆₃₀

R. C (clorofila-b) = 25,4 E₆₆₅ - 4,4 E₆₆₅ - 10,3 E₆₃₀
 P.S. C (clorofila-b) = 20,7 E₆₄₅ - 4,34 E₆₆₅ - 4,42 E₆₃₀
 H.J. C (clorofila-b) = 22,2 E₆₄₅ - 3,88 E₆₆₅ - 4,72 E₆₃₀

R. C (clorofila-c) = 109 E₆₃₀ - 12,5 E₆₆₅ - 28,7 E₆₄₅
 P.S. C (clorofila-c) = 55 E₆₃₀ - 4,64 E₆₆₅ - 16,3 E₆₄₅
 H.J. C (clorofila-c) = 54,6 E₆₃₀ - 6,00 E₆₆₅ - 13,7 E₆₄₅

R. C (carotenóides vegetais) = 7,6 (E₄₈₀ - 1,49 E₅₁₀)

Aparelhagem e equipamento:

- 1) Equipamento para filtração: suporte para filtros tipo miliporo (AA - HA) de 47 mm ou Whatman (GF/C) de 45 mm.
- 2) Frascos de 300 ml para lavagem.
- 3) Tubos graduados para centrifugação de 15 ml de capacidade, tendo tampas de vidro ou de polietileno.
- 4) Cubas espectrofotométricas de pequeno volume, de 10,0 cm de "path length", mas podendo conter 100 ml de solução, ou menos.

Reagentes especiais:

Destilar acetona, cerca de 1% de seu peso, tanto de carbonato de sódio anídrico quanto de sulfito de sódio anídrico. Retire uma fração fervente à temperatura constante de mais ou menos 55,5°C.

Pipetar 100,0 ml de água para um frasco graduado, no qual se adiciona acetona para atingir o volume de 1.000 ml.

A acetona redestilada deve ser conservada fechada hermeticamente em frascos de vidro escuro, e os 90% do reagente preparado em pequenas quantidades para uso (um litro de cada vez). O frasco deste reagente deve ser sempre mantido quase cheio.

Suspensão de carbonato de magnésio:

Adicionar aproximadamente 1,0 g de carbonato de magnésio, finamente pulverizado, para 100 ml de água destilada em um frasco Erlenmeyer bem arrolhado. Agitar vigorosamente o frasco para homogeneizar a suspensão imediatamente antes de usar.

PROCESSO DO FRACIONAMENTO - Além da técnica da clorofila achamos também de igual necessidade, descrever o método utilizado para se fracionar o fitoplâncton, pois, é fundamental o estudo da distribuição por tamanho das células do fitoplâncton quer sob o ponto de vista estático ("standing-stock") ou dinâmico (produção da matéria orgânica). O fitoplâncton, sob o ponto de vista de tamanho, pode ser dividido em dois grandes grupos: o microfitoplâncton, constituído por células maiores que 50 μ , e o nanofitoplâncton, por células menores que 50 μ . Para se fracionar o fitoplâncton (= separar o micro do nanofitoplâncton) basta que se separe as células de diferentes tamanhos através de um meio mecânico, como por exemplo, filtrando-se uma amostra de fitoplâncton através de redes ou filtros, cujos poros apresentem um diâmetro de 50 μ . As duas frações (a retida e a filtrada) poderão, a seguir, ser estimadas em termos do número de células, ou de pigmentos, ou ainda de impulsos radioativos quando se utilizar um radionuclídeo como traçador. Para que o leitor possa melhor visualizar a técnica na prática, apresentamos um esquema mostrando as fases do método do fracionamento (Fig. 10).

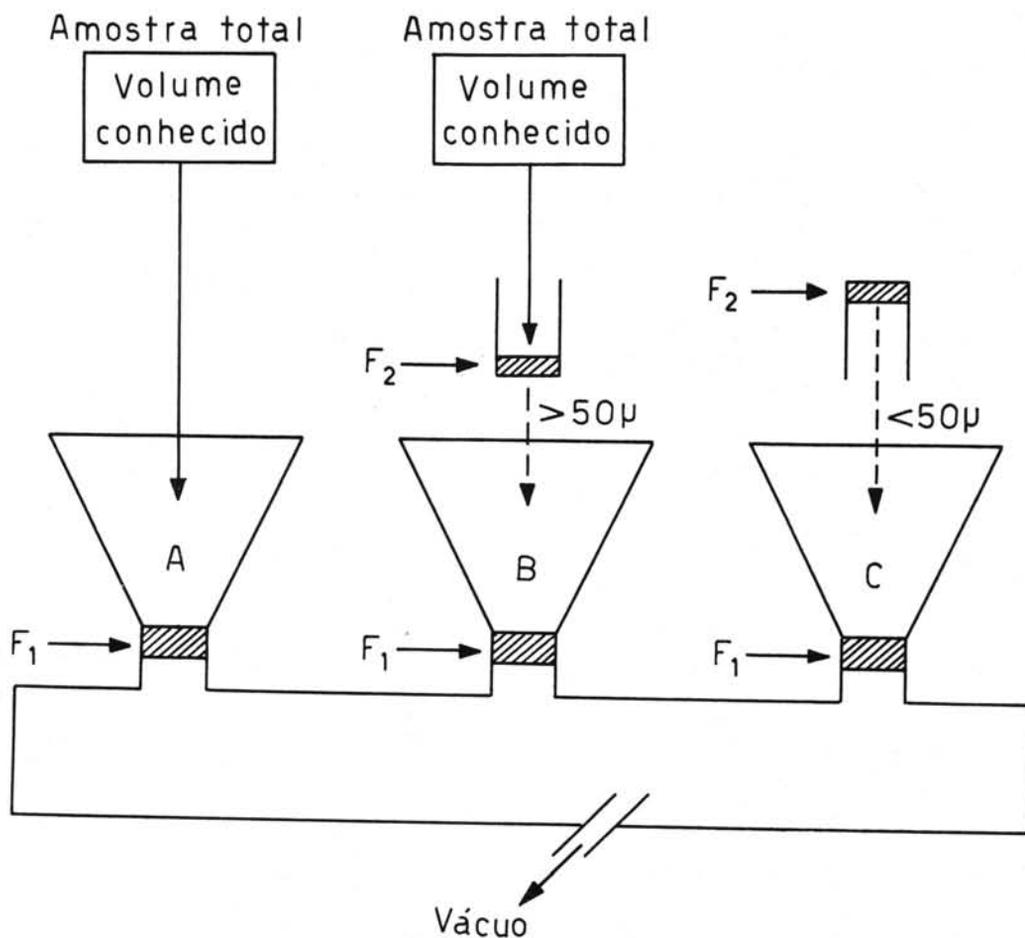


Fig. 10 - Esquema mostrando as diversas fases da técnica utilizada para o fracionamento do fitoplâncton.

F_1 = Filtro miliporo tipo H.A. adaptado a um conjunto de porta-filtros (filtrador a vácuo).

F_2 = Rede de nylon com poro de 50μ de diâmetro adaptada num tubo de PVC.

A = Retenção de todo o plâncton.

B = Retenção do plâncton não retido em F_2 , isto é, do plâncton $< 50\mu$.

C = Retenção do plâncton retido em F_2 , isto é, do plâncton $> 50\mu$.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece as sugestões e revisão aos Professores Dr. Plínio Soares Moreira e Dr. José G. Tundisi.

BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, M.B. 1956. Excretion of organic compounds by *Chlamydomonas*. Arch. Mikrobiol., 24:163.
- ANTIA, N.J., McALLISTER, C.D., PARSONS, T.R., STEPHENS, K. & STRICKLAND, J.D.H. 1963. Further measurements of primary production using a large-volume plastic sphere. Limnol. Oceanogr., 8:166-183.
- ARNON, D.I., WHATELY, F.R. & ALLEN, M.B. 1958. Assimilatory power in photosynthesis. Science, N.Y., 127:1026.
- BROWN, A.H., FAGER, E.W. & GAFFRON, H. 1949. Kinetics of a photochemical intermediate in photosynthesis. In: Franck, J. & Loomis, W.E., eds - Photosynthesis in plants. Iowa State College Press, p. 403-422.
- & WEIS, D. 1959. Relation between respiration and photosynthesis in green alga, *Ankistrodesmus braunii* - Pl. Physiol., 34:224-234.
- BUCHANAN, D.L., MAKAO, A. & EDWARDS, G. 1953. Carbon isotope effects in biological systems. Science, N.Y., 117:541-545.
- BUCHBINDER, L., SOLOWEY, M. & PHELPS, E.B. 1941. Studies on microorganisms in simulated room environments. III. The survival rates of Streptococci in the presence of natural daylight and sunlight and artificial illumination. J. Bact., 42:353-366.
- CREITZ, G.I. & RICHARDS, F.A. 1955. The estimation and characterization of plankton populations by pigments analysis. III. A note on the use of "Millipore" membrane filters in the estimation of plankton pigments. J. mar. Res., 14 (3):211-216.
- DOTY, M.S. 1955. Currents status of carbon-fourteen method of assaying productivity of the ocean. Univ. Hawaii Ann. Rep., 55 p. (mimeo).
- & OGURI, M. 1959. The carbon-14 technique for determining primary plankton productivity. Pubbl. Staz. zool. Napoli, 31 (Suppl.): 70-94.
- FOGG, G.E. 1958. Extracellular products of phytoplankton and the estimation of primary production. Rapp. P.-v. Réun. Cons. perm. int. Explor. Mer, 144:56-60.
- FØYN, E. & HANNEBORG, S. 1971. Determination of ^{14}C labelled carbonate in solution. Mar. Biol., 8 (1):57-59.
- FRANCA, E.P. 1961. Manual de biofísica, fasc. 6. Metodologia de radioisótopos e suas aplicações em biologia e medicina. Rio de Janeiro, Universidade do Brasil, 247 p.
- FREY, D.G. & STAHL, J.B. 1958. Measurements of primary production on Southampton Island in the Canadian Arctic. Limnol. Oceanogr., 3 (2):215-221.
- GAARDER, T. & GRAN, H.H. 1927. Investigations of the production of plankton in the Oslo Fjord. Rapp. P.-v. Réun. Cons. perm. int. Explor. Mer, 42:3-48.
- GOLDMAN, C.R. 1968. The use of absolute activity for eliminating serious errors in the measurement of primary productivity with C^{14} . J. Cons. perm. int. Explor. Mer, 32 (2):172-179.
- GUILLARD, R.R.L. & WANGERSKY, P.J. 1958. The production of extra-cellular carbohydrates by some flagellates. Limnol. Oceanogr., 3 (4):449-454.

- JITTS, H.R. & ROTSCHI, H. 1957. Radioisotopes in Scientific Research. Vol. IV, Proc. 1st UNESCO int. Cong., Paris, 607 p.
- JOHNSTONE, J., SCOTT, A. & CHADWICK, H.C. 1924. The marine plankton. Liverpool Univ. Press, 194 p.
- JONES, G.E., THOMAS, W.H. & HAXO, F.T. 1958. Preliminary studies of bacterial growth in relation to dark and light fixation of $C^{14}O_2$ during productivity determinations. Spec. scient. Rep. U.S. Fish Wildl. Serv. Fisheries (279):79-86.
- JØRGENSEN, E.G. & STEEMANN-NIELSEN, E. 1960. Effect of daylight and artificial illumination on the growth of *Staphylococcus aureus* and some other bacteria. Physiologia Pl., 13:534-538.
- KING, J.E. & HIDA, T.S. 1957. Zooplankton abundance in the Central Pacific. Pt. II. Fishery Bull. Fish Wildl. Serv. U.S., 57:111-144.
- LASKER, R. & HOLMES, R.W. 1957. Variability in retention of marine phytoplankton by membrane filters. Nature, Lond., 180:1.295.
- MILLER, C.P. & SCHAD, D. 1944. Germicidal action of daylight on Meningococci in dried state. J. Bact., 47:79-84.
- MITCHELL-INNES, B.A. 1967. Primary production studies in the South-West Indian Ocean. Invest. Rep. Oceanogr. res. Inst. S. Afr., (14):1-20.
- MORRIS, I., YENTSCH, M. & YENTSCH, C.S. 1971. Relationship between light carbon dioxide fixation and dark carbon dioxide fixation by marine algae. Limnol. Oceanogr., 16 (6):854-858.
- ODUM, H.T. 1957. Primary production measurements in eleven Florida springs and a marine turtle-grass community. Limnol. Oceanogr., 2 (1): 85-97.
- PARK, K., HOOD, D.W. & ODUM, H.T. 1958. Diurnal pH variation in Texas bays, and its application to primary production estimation. Publs Inst. mar. Sci. Univ. Texas, 5:47-64.
- PATTEN, B.C. 1966. The biocoentic process in an estuarine phytoplankton community. Oak Ridge, Oak Ridge National Laboratory, 95 p.
- PHONLOR, G. 1968. An apparatus for "in situ" primary production studies. Araucariana-Zool., 1:3-6.
- PRATT, D.M. & BERKSON, H. 1959. Two sources of error in the oxygen light and dark bottle method. Limnol. Oceanogr., 4 (3):328-334.
- PRINGSHEIN, E.G. 1949. Pure cultures of algal; their preparation and maintenance. London, Cambridge University Press, 245 p.
- PROVASOLI, L. & PINTNER, I.J. 1960. Artificial media for fresh-water algae: problems and suggestions. In: The ecology of algae. The Pymatuning Symposia in Ecology, Spec. Publ. 2:84-96.
- RABINOWITCH, E.I. 1945. Photosynthesis and related processes. New York, Interscience, vol. 1, 599 p.
- _____ 1956. Photosynthesis and related processes. New York, Interscience, vol. 2, part 2, p. 1925-1939.
- RICHARDS, F.A. & THOMPSON, T.G. 1952. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. II. J. mar. Res., 11 (2): 156-172.

- RUSSELL-HUNTER, W.D. 1970. Aquatic productivity: an introduction to some basic aspects of biological oceanography and limnology. New York, Macmillan, 306 p.
- RYTHER, J.H. 1956. Photosynthesis in the ocean as a function of light intensity. *Limnol. Oceanogr.*, 1 (1):61-70.
- SEN, N. & FOGG, G.E. 1966. Effects of glycollate on the growth of a planktonic *Chlorella*. *J. exp. Bot.*, 17:417-425.
- SESTÁK, Z., CATSKY, J. & JARVIS, P.G., ed. 1971. Plant photosynthetic production: manual of methods. The Hague, Junk, 818 p.
- SOROKIN, Yu I. 1960. Determination of the isotope effect during labelled carbon dioxide assimilation in photosynthesis and chemosynthesis. *Microbiologiya*, 29:204-208.
- STEEMANN-NIELSEN, E. 1951. Measurements of the production of organic matter in the sea. *Nature, Lond.*, 167:684.
- _____ 1952. The use of radioactive carbon (C-14) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 18: 117-140.
- _____ 1954. On organic production in the oceans. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 19 (3):309-328.
- _____ 1955a. The interaction of photosynthesis and respiration and its importance for the determination of C^{14} discrimination in photosynthesis. *Physiologia Pl.*, 8:945-953.
- _____ 1955b. Production of organic matter in the oceans. *J. mar. Res.*, 14 (4):347-386.
- _____ 1958. Experimental methods for measuring organic production in the sea. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. perm. int. Explor. Mer*, 144: 38-46.
- _____ 1964. Recent advances in measuring and understanding marine primary production. *J. Ecol.*, 52 (Suppl.):119-130.
- _____ 1965. On the determination of the activity in C^{14} -ampoules for measuring primary production. *Limnol. Oceanogr. (Suppl.)* 10: R247-252.
- _____ & HANSEN, V.K. 1959. Light adaptation in marine phytoplankton populations and its interrelation with temperature. *Physiologia Pl.*, 12:353-370.
- _____ & JENSEN, H.K. 1957. Primary oceanic production. The autotrophic production of organic matter in the oceans. *Galathea Rep.*, 1:49-136.
- _____ & KHOLY, A. 1956. Use of C^{14} technique in measuring photosynthesis of phosphorus or nitrogen deficient algae. *Physiologia Pl.*, 9:144-153.
- STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, T.R. 1960. A manual of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd Can.*, (125):1-185.
- _____ & _____ 1965. A manual of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd Can.*, (125), 2nd ed. rev., 203 p.
- _____ & _____ 1968. A practical handbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd Can.*, (167):1-311.

- TEIXEIRA, C. 1969. Estudo sobre algumas características do fitoplâncton da região de Cananéia e o seu potencial fotossintético. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 82 p. (mimeogr.).
- , KUTNER, M.B. & TORGO, F.M.S. 1965. Efeito da respiração bacteriana. *Revta bras. Biol.*, 25 (3):287-294.
- & TUNDISI, J. 1967. Primary production and phytoplankton in Equatorial waters. *Bull. mar. Sci.*, 17 (4):884-891.
- , ————— & SANTORO, J.Y. 1969. Plankton studies in a mangrove environment. VI. Primary production, zooplankton standing-stock and some environmental factors. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.*, 54 (2):289-301.
- TUNDISI, J. & TEIXEIRA, C. 1968. Plankton studies in a mangrove environment. VII. Size fractionation of the phytoplankton: some studies on methods. *Bolm Inst. oceanogr., S Paulo*, 17 (1):89-94.
- VACCARO, R.F. & RYTHER, J.H. 1954. The bactericidal effects of sunlight in relation to "light" and "dark" bottle photosynthesis experiments. *J. Cons. perm. Int. Explor. Mer*, 20:18-24.
- VERDUIN, J. 1951. Photosynthesis in naturally reared aquatic communities. *Physiologia Pl.*, 26:45-49.
- 1957. Daytime variations in phytoplankton photosynthesis. *Limnol. Oceanogr.*, 2 (4):333-336.
- VOLLENWEIDER, R.A., ed. 1969. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. IBP Handbook nº 12. London, International Biological Programme, 213 p.
- & NAUWERCK, A. 1961. Some observations on the C^{14} method for measuring primary production. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 14:214-235.
- WEIS, D. & BROWN, A.H. 1959. Kinetic relationships between photosynthesis and respiration in the algal flagellate *Ochromonas malhamensis*. *Physiologia Pl.*, 34:235-239.
- WIESSNER, W. & GAFFRON, H. 1964. Role of photosynthesis in the light-induced assimilation of acetate by *Chlamydomonas*. *Nature, Lond.*, 201:725-726.
- WILLIAMS, R.B. 1966. Annual phytoplankton production in a system of shallow temperate estuaries. In: Barnes, H., ed. - Some contemporary studies in marine science. London, Allen & Unwin, p. 699-716.
- WRIGHT, R.T. 1964. Dynamics of a phytoplankton community in an ice-covered lake. *Limnol. Oceanogr.*, 9 (2):163-178.
- ZOBELL, C.E. & ANDERSON, D.Q. 1936. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol. Bull.*, 71:324-342.