

Trabalho Conclusão Curso

Bryan Adans da Silva Ribeiro

TÍTULO: “R2-C2” Fotobiorreator para análise do balanço de carbono: inovação para o estudo do papel da biodiversidade aquática

Florianópolis

2018



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Ciências Biológicas

Bryan Adans da Silva Ribeiro

“R2-C2”

Fotobiorreator para análise do balanço de carbono – inovação para o estudo do papel da biodiversidade aquática

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em
Ciência Biológicas do Centro de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do Título
de Bacharel em Ciências Biológicas
Orientador: Prof. Dr. Paulo Antunes Horta Júnior

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor.

Orientações em:

<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Fotobiorreator para análise do balanço de carbono – inovação para o estudo do papel da biodiversidade aquática

Bryan Adans da Silva Ribeiro

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel” e aprovado em sua forma final pelo Programa ...

Florianópolis, 22 de Novembro de 2018.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof., Dr. Carlos Frederico Deluqui Gurgel
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Lidiane Gouvêa
Universidade Federal de Santa Catarina

Geniane Schneider
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado a minha família, ao professor Paulo e à todas as pessoas que fizeram parte da minha história na graduação.

AGRADECIMENTOS

De início, venho agradecer ao Professor Paulo pelos ensinamentos e paciência em me orientar, agradeço também pela oportunidade que me proporcionou de realizar meu TCC na Universidade do Algarve em Portugal, e passar 1 mês longe do Brasil. Agradeço também ao pessoal do Laboratório de Ficologia da UAlg, principalmente André e Cátia que me ajudaram com informações e auxílio durante o tempo que estive por lá, até mesmo com informações e indicação de referências para o meu trabalho.

Agradeço a UFSC, pelos 5 anos que passei na graduação, a todos os meus amigos feitos durante o curso, ao trio ternura pela amizade, a 14.1 que sempre será a melhor turma com quem tive a oportunidade de compartilhar alegrias, ao pessoal do LAFIC, por esses dois anos no laboratório, onde participei de projetos de taxonomia até o meu TCC de agora.

Agradeço a minha namorada Evelyn, por este 1 ano compartilhado, de muita paciência atenção e carinho mútuo, além da paciência de passar 1 mês longe de mim, que talvez tenha sido um alívio pra ela hihi, te amo.

Aos meus pais principalmente, por me ajudarem tanto no apoio financeiro, porém, mais do que isso, por me apoiarem sempre na escolha que fiz pra minha vida que é se tornar biólogo, obrigado por tudo, e eu espero poder recompensá-los um dia.

Por fim, esta é mais uma etapa da minha vida que venho a concluir, agradeço principalmente aos erros cometidos durante esta fase que passou com certeza eu cresci muito como pessoa e como profissional, porém, nada está encerrado e com certeza muito aprendizado há de vir ainda.

RESUMO

O lançamento de CO₂ antropogênico na atmosfera terrestre, do início da revolução industrial até os dias atuais, têm causado mudanças biogeoquímicas nos oceanos. Tais mudanças caminham em direção ao desequilíbrio ambiental. Estudos indicam que o aumento da concentração do CO₂ nos oceanos poderá passar dos atuais 406 ppm para cerca de 930 ppm, considerando os cenários mais pessimistas para 2100. Este incremento causará a diminuição do pH da água do mar em até 0,4 unidades acidificando os oceanos, e assim, impactará negativamente diversos organismos recifais como, por exemplo, as algas calcárias conhecidas como rodolitos. Certamente, a influência sobre o ciclo do carbono marinho e atmosférico, precisa de mais observações e estudos, assim como da criação de novas ferramentas e novos métodos que auxiliem na compreensão dos serviços ecológicos proporcionados pelos produtores primários, como, por exemplo, as algas. No presente estudo, construímos e testamos um novo instrumento de análise laboratorial, o qual tem como finalidade analisar as resultantes da produção primária e o fluxo de CO₂ decorrente do funcionamento fisiológico de diferentes organismos e comunidades. O sistema foi testado com a alga calcária *Lithophyllum incrustans*, formadora de bancos de rodolitos e sistemas recifais biogênicos no Atlântico Norte. Os resultados apresentados pelo sistema de incubação revelaram um aumento nas taxas de produção de O₂ em maiores irradiâncias, assim como consumo de CO₂ atmosférico e aquoso o equipamento aqui apresentado poderá contribuir para o entendimento da captação e ciclagem do dióxido de carbono presente nos sistemas marinhos, esclarecendo com mais precisão o serviço ambiental prestado pelos diferentes ambientes como aqueles representados pelos bancos de rodolito.

Palavras-chave: *Lithophyllum*, ciclo do carbono, acidificação, algas calcárias

ABSTRACT

The release of anthropogenic CO₂ into the Earth's atmosphere from the start of the industrial revolution to the present day has caused biogeochemical changes in the oceans. Such changes are moving towards an environmental imbalance, which can already be seen in several places on the planet. Studies indicate that the increase in CO₂ concentration in the oceans could rise from the current 406 ppm to about 930 ppm, taking into account the most pessimistic scenarios for 2100. This increase will cause the seawater pH to decrease by up to 0.4 units by acidifying the oceans, and thus will negatively impact various reef organisms, such as calcareous algae known as rhodoliths. Certainly, the influence on the marine and atmospheric carbon cycle requires further observations and studies, as well as the creation of new tools and new methods to aid in understanding the ecological services provided by primary producers, such as algae. In the present study, we constructed and tested a new instrument of laboratory analysis, which aims to analyze the results of primary production and CO₂ flow due to the physiological functioning of different organisms and communities. The system was tested with the limestone algae *Lithophyllum incrustans*, rhodolite bank formers and biogenic reef systems in the North Atlantic. The results presented by the incubation system showed an increase in O₂ production rates at higher irradiances, as well as CO₂, atmospheric and aqueous consumption, the equipment presented here may contribute to understanding the uptake and cycling of carbon dioxide present in the systems clarifying with more precision the environmental service provided by different environments such as those represented by the rhodolith banks

Keywords: *Lithophyllum*, carbon cycle, acidification, calcareous algae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Fluxo líquido anual do CO ₂ entre ar e oceano, mais de 3 milhões de dados da superfície da água foram utilizados para mensurar o fluxo. (Takahashi et al., 2009).	29
Figura 2 – Níveis mensais de CO ₂ globalmente calculados sobre locais de superfície marinha desde 2014. A linha vermelha tracejada representa os valores médios mensais, centrados no meio de cada mês. A linha preta representa o mesmo, após correção para o ciclo sazonal médio (Adaptado de: Ed Dlugokencky e PieterTans, NOAA / ESRL (www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/)).....	30
Figura 3 – Distribuição dos bancos de rodolitos pelo mundo. (Bosence, 1983; Foster, 2001).....	33
Figura 4 – Modelo da câmara de incubação in situ utilizada por (Chisholm, 2003)..	34
Figura 5 – Esquema do experimento realizado por (Silva et al., 2008)	34
Figura 6 – Em (A) os aquários com os rodolitos no interior do Fitoclima 750 E (Aralab,Lisboa,Portugal), em (B) imagem aproximada dos rodolitos no interior de um dos aquários.....	15
Figura 7 - Em (A) temos o mapa de Portugal, em (B) o mapa está sinalizando o Sul de Portugal em (C) temos a localização da Ria Formosa no Algarve (“36° 59' 31.46" N 7° 55' 21.90").	16
Figura 8 - Imagem (A) Medidas internas da câmara de incubação, composta pela parte atmosférica (campânula) e pela parte aquática (cone truncado), Imagem (B) Câmara desmontada com os tubos acoplados, e o fio da bomba de circulação.....	17
Figura 9 - Disposição dos tubos na câmara (Imagem adaptada do trabalho de (Silva, 2003)).....	18
Figura 10 - Aparelhos de medição utilizados A –Termometro (HOBO Pendant® 64K - UA-001-64, ONSET®); B - Oxímetro(Optode - Oxygenoptode , MiniDO2T Logger, PME, EUA); C- Radiometro (Irradiance ODYSSEY - sensor PAR, Odyssey Light logger) e D- Coluna de troca gasosas.....	19
Figura 11 - Sistema IRGA (A- IRGA EGM-4, PP Systems, Reino Unido CO ₂ água) e (B- IRGA EGM-4, PP Systems, Reino Unido, CO ₂ ar).....	19
Figura 12 - Sistema de iluminação na imagem (A) os três temporizadores, na figura (B) o esquema de alocação dos três conjuntos de lâmpadas com os temporizadores acoplados.	20

<p>Figura 13 - Ilustração (A) e foto (B) do sistema de incubação e seus componentes, números algébricos indicam aparelhos e demais componentes, números romanos indicam as passagens da água e do ar; (a' e a'') indicam os desumidificadores ou drys.</p>	21
<p>Figura 14 - Gráficos dos gases x irradiância para cada foto período (dia longo e dia curto).....</p>	24
<p>Figura 15 - Gráfico de colunas com os resultados obtidos pela ANOVA, cada coluna representa o valor das taxas médias de CO₂ presente no ar (azul claro) e na água (azul escuro) em função das diferentes irradiâncias. Cada coluna foi representada com uma letra de A à H.</p>	25
<p>Figura 16 - Gráfico com os resultados obtidos pela ANOVA, cada coluna foi representada com uma letra, e representam os valores das taxas médias de O₂ na água em função dos diferentes fotoperíodos. Letras que se repetem em outras colunas indicam que não há significativas ($p > 0,05$) entre as colunas. A cor marrom representa dia curto e a cor azul escura dia longo.</p>	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados das análises de ANOVA bifatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis, as quais, são as concentrações de CO₂ na água e no ar, dependentes da Irradiância. Os efeitos significativos estão com os dados em negrito.....
.25

Tabela 2 - Resultados das análises de ANOVA bifatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis dependentes, ou seja, oxigênio dependente de irradiância e fotoperíodo.26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	29
1.1	Balanco global do Carbono	29
1.2	Influência das mudanças climáticas sobre as algas calcárias	31
1.3	Importância das algas calcárias	32
1.4	Justificativa do trabalho.....	33
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Material biológico	15
3.2	Câmara de Incubação (Fotobiorreator)	16
3.2.1	Demais Componentes da câmara de incubação.....	18
3.2.2	Sistema de iluminação artificial	19
3.2.3	Funcionamento do fotobiorreator	20
3.3.3	Incubações	23
3.3.4	Análises estatísticas	23
4	RESULTADOS	23
4.1	Resposta do sistema as incubações	23
4.2	Fluxo dos gases, consumo x produção e suas relações com as diferentes irradiâncias e diferentes fotoperíodos.	24
5	DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

1.1 Balanço global do Carbono

Cerca de 71% da superfície do nosso planeta é ocupada pelos oceanos. Além de suportarem a maior biodiversidade do nosso planeta, eles influenciam os sistemas climáticos, desempenhando papel fundamental no ciclo global do carbono (Beardal & Raven, 2004; Costanza, 1999). Diferentes ecossistemas marinhos são verdadeiros sumidouros do CO₂ atmosférico, uma vez que até 48% do total de CO₂ emitido por atividades antrópicas têm como destino os oceanos (Sabine et al., 2004). Takahashi et al. (2009), após a análise de 3 milhões de medições da superfície marinha, estimaram que a captação de CO₂ anual por parte dos oceanos do planeta corresponde a 25% da produção total de CO₂ industrial, o qual é estimado em 7,0 Pg-Cano⁻¹. Para que fique mais palatável e fácil de visualizar o fluxo de CO₂ que tem como direção os oceanos em um período anual, ao transformar 1,5 Pentagramas para toneladas, obtemos 1.500.000.000 toneladas, de CO₂ sendo direcionados para os oceanos.

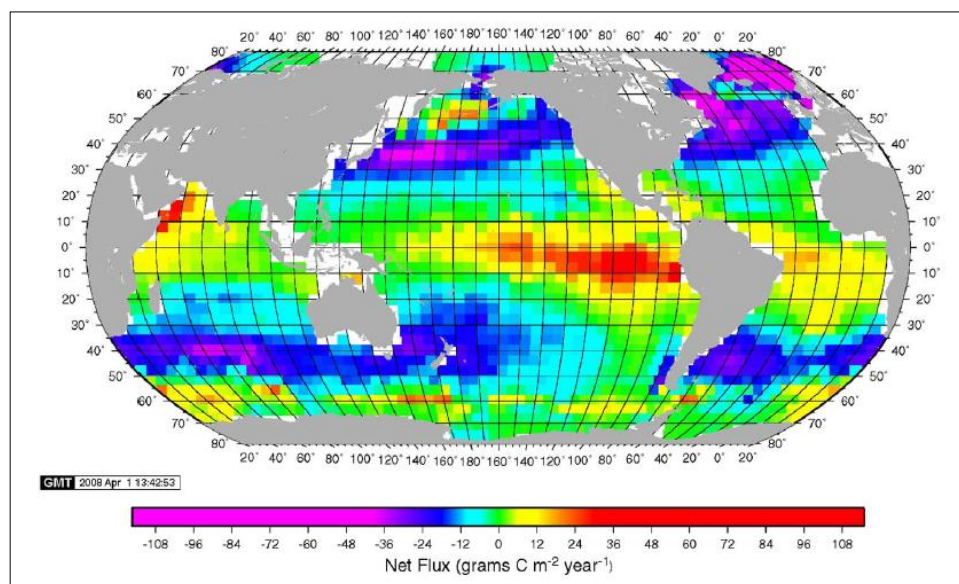


Figura 1– Fluxo líquido anual do CO₂ entre ar e oceano, mais de 3 milhões de dados da superfície da água foram utilizados para mensurar o fluxo. (Takahashi et al., 2009).

Antes do início da revolução industrial e da utilização em massa dos combustíveis fósseis, os valores atmosféricos de CO₂ registrados ao longo dos anos aumentaram de aproximadamente 278 partes por milhão (ppm) (Cao, Caldeira, & Jain, 2007) para uma média anual de 406 ppm até o ano de 2017 como mostrado na (Figura 1). Segundo o Painel Intergovernamental sobre Mudança Climática (IPCC), a previsão é que os valores atmosféricos de CO₂ continuem aumentando, e atingindo 936 ppm em 2100, sendo este o cenário mais caótico.

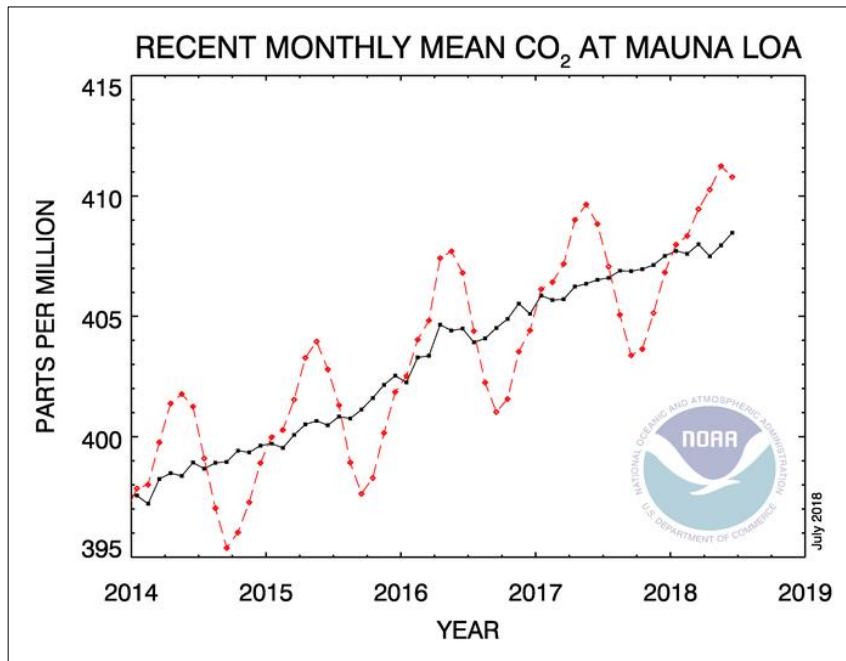
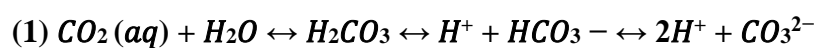


Figura 2 – Níveis mensais de CO₂ globalmente calculados sobre locais de superfície marinha desde 2014. A linha vermelha tracejada representa os valores médios mensais, centrados no meio de cada mês. A linha preta representa o mesmo, após correção para o ciclo sazonal médio (Adaptado de: Ed Dlugokencky e Pieter Tans, NOAA / ESRL (www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/)).

A transferência do CO₂ da atmosfera para os oceanos, se dá pela dissolução do gás na água por diferença de concentração. Este processo é potencialmente acelerado através da fotossíntese de organismos aquáticos que absorvem o CO₂ gasoso. Favorecendo um fluxo da atmosfera para a água. Para entendermos melhor esse processo devemos compreender como o CO₂ interage com a água. Ao ser absorvido pelo oceano o CO₂ reage com as moléculas de água alterando as proporções de ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻). Em meio aquoso, o CO₂ é lentamente hidratado para H₂CO₃, então a água do mar ioniza o CO₂ rapidamente formando HCO₃⁻ e CO₃²⁻, este processo aumenta a concentração do íon hidrogênio (H⁺) levando à diminuição do pH da água do mar, deixando-a menos alcalina (Ishimatsu, Hayashi, Lee, Kikkawa, & Kita, 2005), a equação abaixo demonstra como ocorre o processo:

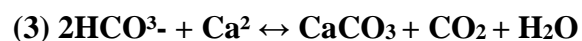


Entretanto, a fixação de CO₂ na forma de carbono orgânico, se dá pelo processo de fotossíntese, desempenhada nos ambientes submersos por algas bênticas, planctônicas e

gramas marinhas. Este processo dependente de irradiância ($h\nu$), CO_2 disponível e água, como demonstra a equação a seguir:



Adicionalmente parte deste carbono pode ser transformado em forma inorgânica pelo processo de calcificação, com a formação carbonato insolúvel, como o Cálcio e Magnésio, os quais, são sedimentados e hoje compõem boa parte do sedimento do fundo das plataformas continentais ao redor do mundo. Boa parte desse processo é resultado da atividade biológica de algas como as coralináceas incrustantes, que apresentam este mineral em 95% de sua massa seca (Blunden et al., 1997). A calcificação se dá no processo de formação da parede celular e apresenta o seguinte balanço estequiométrico:



Após esta reação, parte do CO_2 é potencialmente disponibilizado na água e utilizado em processos biológicos como a própria fotossíntese da alga, permanecendo como fração solúvel. Outra fonte que contribui para o balanço de CO_2 é a respiração da biota. Assim o fluxo de CO_2 entre a atmosfera e o oceano é resultado da capacidade dos dois sistemas de produzirem, a todo momento variação nas concentrações, para mais ou menos induzindo a dissolução do gás. Por exemplo, em regiões próximas ao equador, as águas quentes favorecem uma transferência maior de CO_2 do oceano para a atmosfera, enquanto em médias e altas latitudes predomina o processo inverso, em que CO_2 da atmosfera é dissolvido nas águas frias (Takahashi et al., 2009, Figura 1) (Martins, Pereira, Lopes, & de Andrade, 2003).

1.2 Influência das mudanças climáticas sobre as algas calcárias

Altamente dependentes do processo de calcificação, as algas coralináceas necessitam que estas reações não sejam perturbadas para que haja sucesso na construção de suas estruturas calcárias. A alta concentração de CO_2 juntamente com outros fatores como a temperatura, por exemplo (Martin & Hall-spencer, 2017; Noisette, Duong, Six, Davoult, & Martin, 2013), influenciam diretamente na taxa de calcificação destas algas coralináceas. Em cenários projetados para o futuro uma das previsões aponta que, caso a $p\text{CO}_2$ venha a ser de 750 até

1000 μatm , estima-se que a calcificação poderá ser reduzida em até 80% (Noisette et al., 2013). Assim, a taxa de precipitação de carbonato de cálcio, a qual, é estimada em $486.7\text{g CaCO}_3 \text{ m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$ (Martin, Clavier, Chauvaud, & Thouzeau, 2007) seria reduzida para aproximadamente $97\text{g CaCO}_3 \text{ m}^{-2} \text{ yr}^{-1}$. Estas transformações trariam grande perda aos estoques de CaCO_3 marinho, já que as algas coralinas contribuem com cerca de 50% de todo CaCO_3 produzido nos recifes (Gattuso et al, 1998, Van Der Heijden & Kamenos, 2015)

Um importante fator que modula a calcificação das algas é a fotossíntese, porém, esta reação, ao contrário da calcificação, é beneficiada em relação a alta concentração de CO_2 e baixo pH da água (Semesi, Kangwe, & Björk, 2009). Por meio da fotossíntese que são produzidos os açúcares necessários para construção de uma rede fibrosa que auxilia na fixação dos cristais de calcita precipitados na calcificação (Bilan & Usov, 2001; Borowitzka, 1981), além disso, a fotossíntese conjuntamente com a respiração, também é responsável pela produção do ATP utilizado na reação de calcificação,

1.3 Importância das algas calcárias

As algas calcárias formam estruturas que são essenciais para inúmeras espécies marinhas, pois abrigam principalmente etapas iniciais do desenvolvimento de invertebrados e peixes, (Amado-Filho et al., 2012; Kamenos, Moore, & Hall-Spencer, 2004), estas estruturas vivas, tornam o ambiente marinho mais complexo, e tornam-se verdadeiros mantenedores da biodiversidade marinha, (Bosence, 1983; Foster, 2001).

Reforçando a importância da algas coralinas, e apesar da controvérsia de alguns estudos considerarem recifes como fontes de CO_2 para a atmosfera (Frankignoulle et al., 1996; Gattuso et al., 1996; Ware et al., 1992), devemos enfatizar que diversos organismos compõem um recife, destacando-se os produtores primários como as algas calcárias que influenciam no balanço do CO_2 , além de uma grande diversidade de calcificadores

Além de sua função estrutural, as algas calcárias tem papel fundamental na retenção de CO_2 , principalmente pela capacidade de captarem o CO_2 do meio através da fotossíntese, assim como observado por (Oliveira, 1996),

Os bancos de rodolitos, estão presentes desde o infralitoral até grandes profundidades, em substratos consolidados e não-consolidados, sendo encontrados em todos os oceanos (Steneck, 1986), na (figura 3) percebemos tamanha distribuição latitudinal dos bancos de rodolitos pelo globo, isto nos demonstra tamanha influência das algas coralinas para os ambientes marinhos

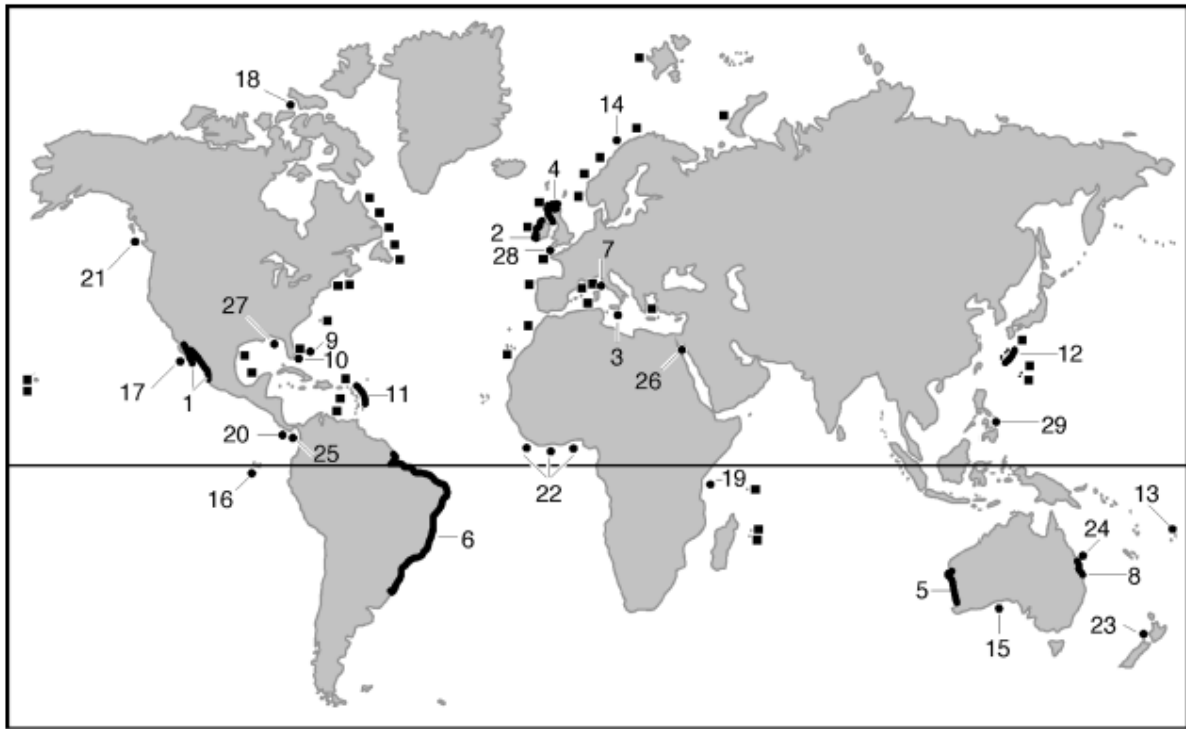


Figura 3 – Distribuição dos bancos de rodolitos pelo mundo. (Bosence, 1983; Foster, 2001).

1.4 Justificativa do trabalho

Com o intuito de compreender como os recifes coralinos participam do ciclo do carbono, diversas pesquisas já foram realizadas afim de traduzir a importância e a contribuição das algas calcárias, principalmente aquelas que formam bancos de rodolitos.

Um estudo *in situ* fez a análise de uma comunidade coralina composta por rodolitos, com o objetivo de analisar a produção de carbono orgânico e inorgânico produzido (Martin et al., 2007). É interessante ressaltar o método de análise utilizado onde uma câmara de incubações foi utilizada para realizar análises periódicas nesse sistema recifal. Semelhante a este o estudo, (Chisholm, 2003), analisou produtividade primária de alga calcária incrustante construtora de recife, no qual, foi instalada uma câmara *in situ* (figura 4). Estes autores estimaram o balanço de CO₂ a partir da análise da alcalinidade.

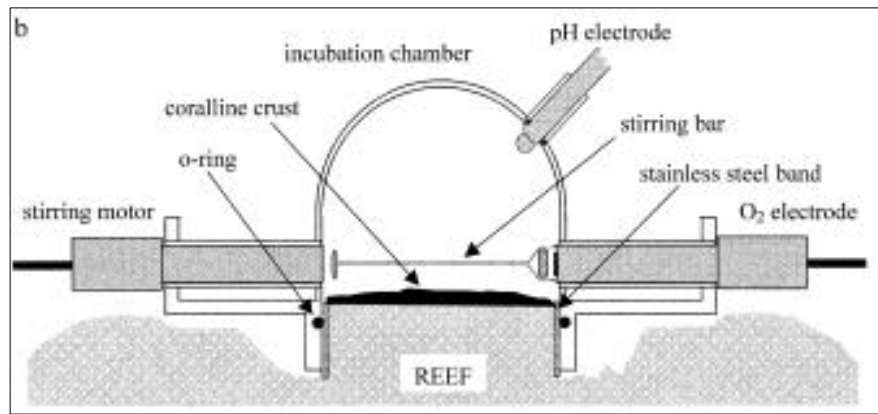


Figura 4 – Modelo da câmara de incubação in situ utilizada por (Chisholm, 2003).

Por sua vez, Silva et al., 2008, utilizaram câmaras submersas parcialmente enterradas no substrato do ambiente marinho, acopladas a analisador de CO₂ (IRGA), para analisar o fluxo carbono em um banco da grama marinha *Posidonia oceânica* como demonstrado na Figura 5. Para o presente estudo, a peça superior da câmara deste experimento foi reutilizada, além disso, utilizamos dois IRGA (EGM-4, PP Systems, UK), ao invés de somente um, assim foi possível a análise do fluxo de CO₂ entre água e atmosfera.

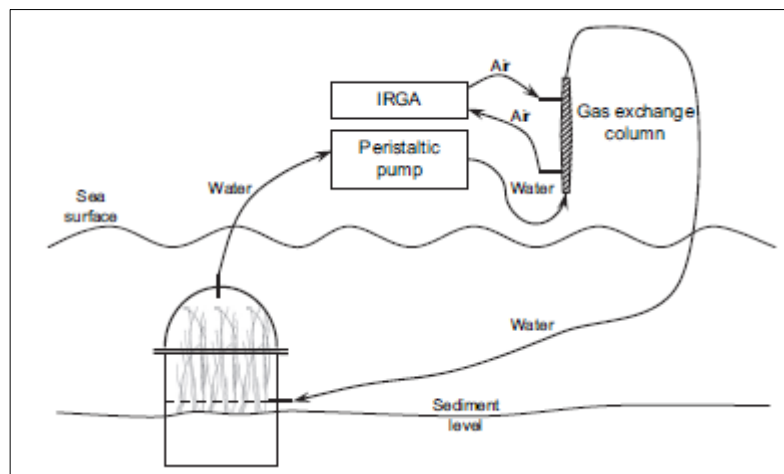


Figura 5 – Esquema do experimento realizado por (Silva et al., 2008)

Novos métodos e pesquisas têm surgido afim de explicar e esclarecer a relação dos bancos de rodolitos com o ciclo do carbono, (Amâncio, 2007). Chama-se a atenção para a criação de metodologias que envolvam especificamente rodolitos, com atenção especial aquelas que possuam capacidade de captar pequenas variações de O₂ e CO₂ atmosférico. O desenvolvimento de equipamentos, com esse intuito, poderia se tornar uma alternativa para análises sobre a participação dos bancos de rodolitos no ciclo do carbono, através de uma ótica ambiental mais realista.

Nesse sentido, o presente estudo teve como enfoque a construção e teste de um fotobiorreator, que possui como foco principal, analisar a influência da produção primária e calcificação das algas calcárias no balanço total de CO₂ em um sistema fechado que contempla água e atmosfera. Esperamos com este trabalho contribuir com ferramentas que aprimorem o entendimento do funcionamento da biodiversidade marinha, complementando as ferramentas de gestão de seus produtos e serviços.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar um novo equipamento para descrever o balanço de CO₂ entre atmosfera-água, sob influência de reações biológicas.

2.2 Objetivos específicos

1. Construir um fotobiorreator e descrever seus componentes físicos;
2. Explicar o funcionamento do fotobiorreator;
3. Realizar incubações no fotobiorreator para verificar o balanço de CO₂ entre ar-água.;
4. Analisar estatisticamente os dados obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico

Os rodolitos utilizados em cada incubação (Figura 6), foram coletados na Ria Formosa, Algarve, Portugal ("36° 59' 31.46" N 7° 55' 21.90") durante marés baixas de sizígia.

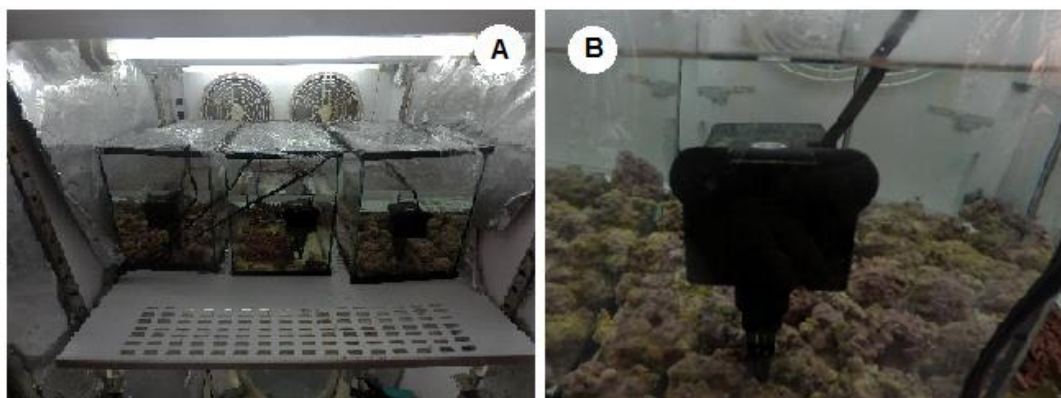


Figura 6 – Em (A) os aquários com os rodolitos no interior do Fitoclima 750 E (Aralab,Lisboa,Portugal), em (B) imagem aproximada dos rodolitos no interior de um dos aquários.

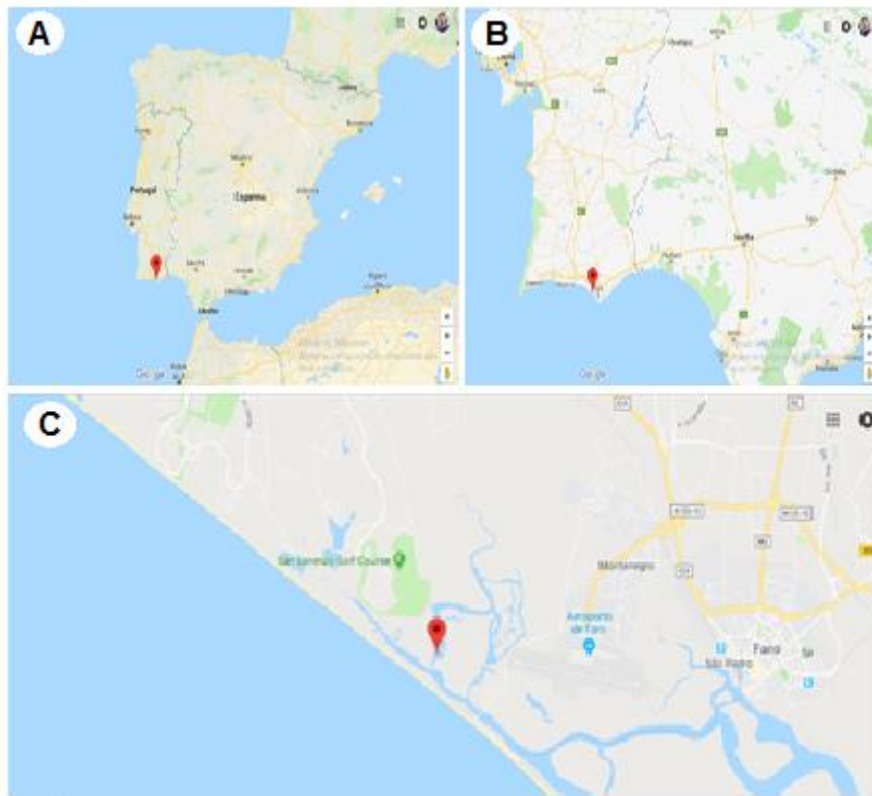


Figura 7 - Em (A) temos o mapa de Portugal, em (B) o mapa está sinalizando o Sul de Portugal em (C) temos a localização da Ria Formosa no Algarve ("36° 59' 31.46" N 7° 55' 21.90").

Após coletados, os rodolitos foram levados até o Centro Laboratorial do Ramalhete (Centro de Ciências Marinhas (CCMar- UAlg)), onde foram identificados. Os rodolitos foram mantidos em tanques de 30 litros a temperatura ambiente média de 17°C, durante o período de dois meses, de Dezembro até meados do fim de Janeiro. Após este período, os rodolitos foram transportados até o laboratório de ficologia no (CCMar – Ualg Gambelas), onde foram alocados em aquários de 15 litros alocados dentro de um Fitoclima 750 E (Aralab, Lisboa, Portugal), a uma temperatura de 14-16 °C e irradiância de 100 micromol, além disso, salientamos que a água utilizada nos aquários era trocada a cada 48 horas.

3.2 Câmara de Incubação (Fotobiorreator)

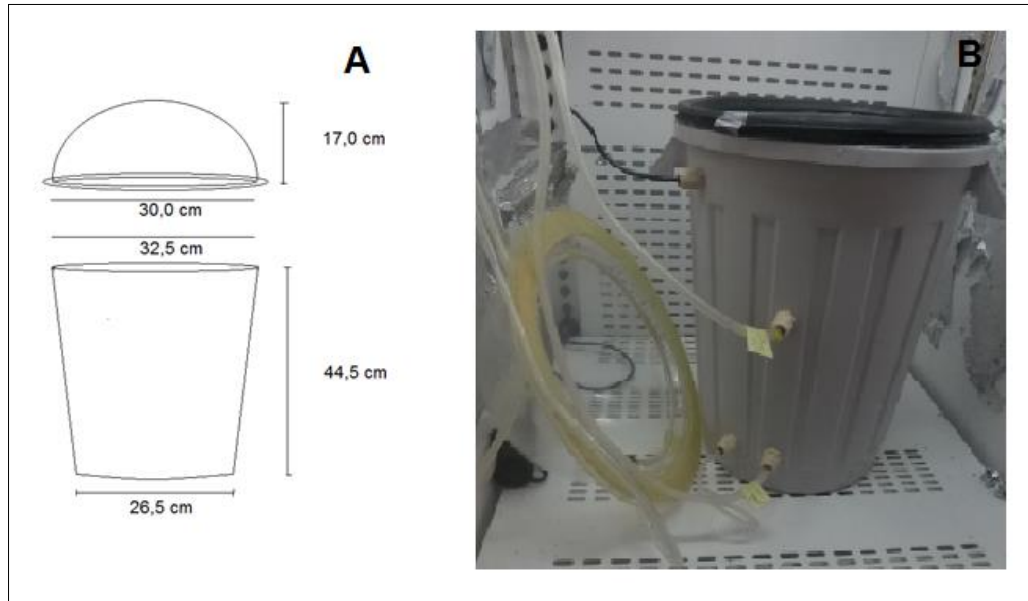


Figura 8 - Imagem (A) Medidas internas da câmara de incubação, composta pela parte atmosférica (campânula) e pela parte aquática (cone truncado), Imagem (B) Câmara desmontada com os tubos acoplados, e o fio da bomba de circulação.

A câmara de incubação possui duas partes principais, a campânula e o balde em forma de cone truncado, nestes se localizam o ar e água respectivamente. A parte atmosférica, representada pelo espaço da campânula, a qual, têm a estrutura de uma semi-esfera de acrílico transparente, possuía 17 cm de altura por 30 cm de diâmetro, totalizando o volume 7053 cm³ que equivalem a 7,053 L.

As outra parte da câmara, onde ficava a água, media 44,5 cm de altura, 26,5 cm de diâmetro da base inferior e 32,5 cm de diâmetro da base superior, totalizando 30 litros, então, somando os volumes da parte atmosférica da nossa câmara (campânula) com a parte aquática, temos o volume total interno de 37,053 litros. Um fator que pode ser relevante, as paredes deste cilindro eram opacas, não permitindo a passagem de luz externa.

Os tubos utilizados para a passagem do ar e da água possuíam 3,2 mm de diâmetro, e eram de material plástico flexível da marca Tygon. Na parte atmosférica **(2)** o tubo foi inserido em uma perfuração já existente **(3)**, localizado no centro da parte superior da campânula. O tubo da parte aquática **(1)**, localizado na lateral do recipiente **(4)**, tal disposição está representada na figura abaixo.

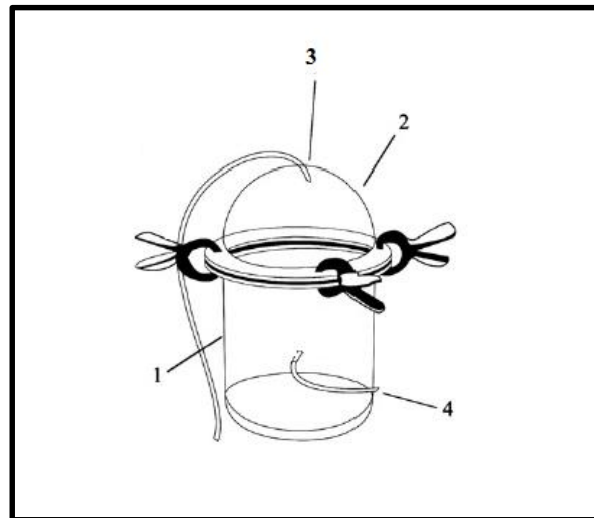


Figura 9 - Disposição dos tubos na câmara (Imagem adaptada do trabalho de (Silva, 2003)

Além perfurações com auxílio de uma furadeira elétrica foram feitas, nestas perfurações, os tubos foram encaixados, e na área externa de contato do tubo com a perfuração, foi vedado com auxílio de vedadores de rosca. Além das perfurações feitas para alocação das mangueiras (tubos), uma quarta perfuração foi necessária, para passagem do fio de energia até o circulador de água, nesta perfuração também utilizamos um passa fio.

3.2.1 Demais Componentes da câmara de incubação

Para registrar a temperatura da água foi utilizado (Registrador de dados de temperatura / alarme HOBO Pendant® 64K - UA-001-64, ONSET®), para medição de irradiância atingindo os rodolitos utilizamos (Irradiance ODYSSEY - sensor PAR, Odyssey Light logger) e para concentração de oxigênio dissolvido na água utilizamos (Optode - Oxygenoptode , MiniDO₂T Logger, PME, EUA) todos esses instrumentos estavam acoplados de alguma forma no sistema de incubação. Para análise da $p\text{CO}_2$ ar $ep\text{CO}_2$ água foram utilizados dois IRGA's um para análise da água, analisador de gás infravermelho não dispersivo IRGA 1 (EGM-4, PP Systems, Reino Unido) acoplado a uma coluna de troca gasosa (Mini-Modulemembranecontractor, Celgard, USA)em ciclos de (~) 24h. e outro somente para análise IRGA 2 (EGM-4, PP Systems, Reino Unido).

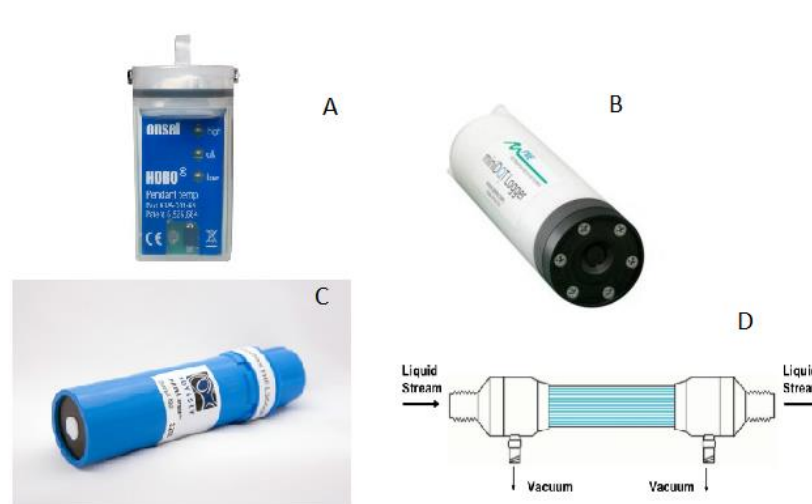


Figura 10 - Aparelhos de medição utilizados A –Termometro (HOBO Pendant® 64K - UA-001-64, ONSET®); B - Oxímetro(Optode - Oxygenoptode , MiniDO2T Logger, PME, EUA); C- Radiometro (Irradiance ODYSSEY - sensor PAR, Odyssey Light logger) e D- Coluna de troca gasosas.



Figura 11 - Sistema IRGA (A- IRGA EGM-4, PP Systems, Reino Unido CO2 água) e (B- IRGA EGM-4, PP Systems, Reino Unido, CO2 ar)

3.2.2 Sistema de iluminação artificial

As lâmpadas utilizadas foram dispostas em linhas com três conjuntos com cinco lâmpadas de LED, cada uma com 15W totalizando 225W. As incubações geralmente duraram o período de 23-24 horas, e os intervalos para aumento e diminuição de irradiância variaram entre as incubações cada conjunto de lâmpada foi acoplado a um timer de ativação e desativação, o qual, foi programado para ligar e desligar em alguns intervalos de tempo, com a finalidade de provocar o aumento e a diminuição da irradiância durante o período de

incubação dos rodolitos. Nas incubações que simularam dias longos a irradiância aumentou a cada uma hora seguindo o seguinte padrão: uma hora para $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$; uma hora para $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e 9,5 horas para a maior intensidade de irradiância $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, após este período, houve a diminuição das intensidades luminosas, seguindo o padrão de duração uma hora para $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ uma hora para $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, até chegar ao período escuro, o qual, durou em média nove horas. Para as incubações de dias curtos, o aumento na intensidade luminosa se deu a cada duas horas, então temos o seguinte padrão duas horas para $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, duas horas para $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e quatro horas para $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a partir desse período a luz foi diminuindo seguindo o padrão de duas horas para $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, até a escuridão total que durou oito horas.

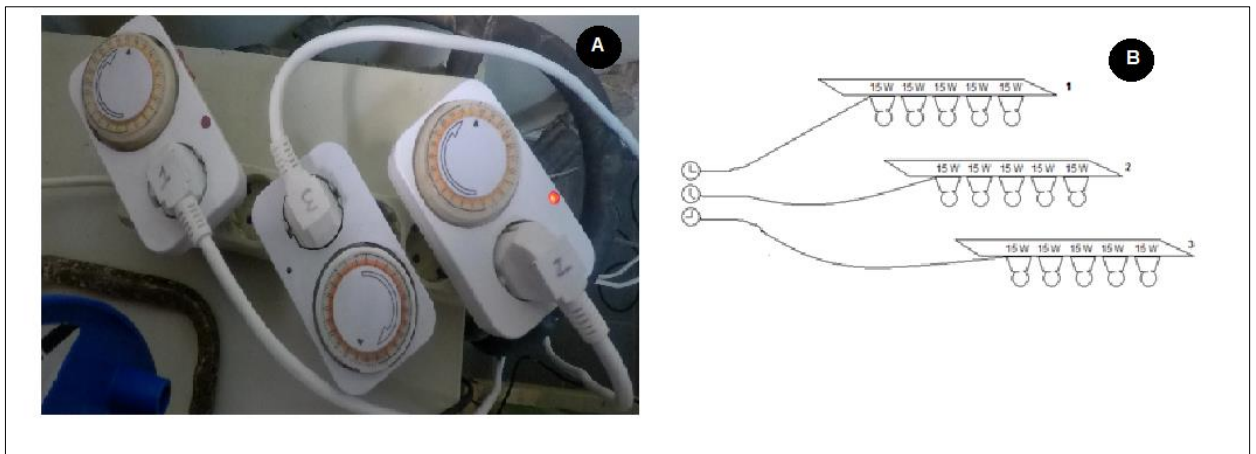


Figura 12 - Sistema de iluminação na imagem (A) os três temporizadores, na figura (B) o esquema de alocação dos três conjuntos de lâmpadas com os temporizadores acoplados.

3.2.3 Funcionamento do fotobiorreator

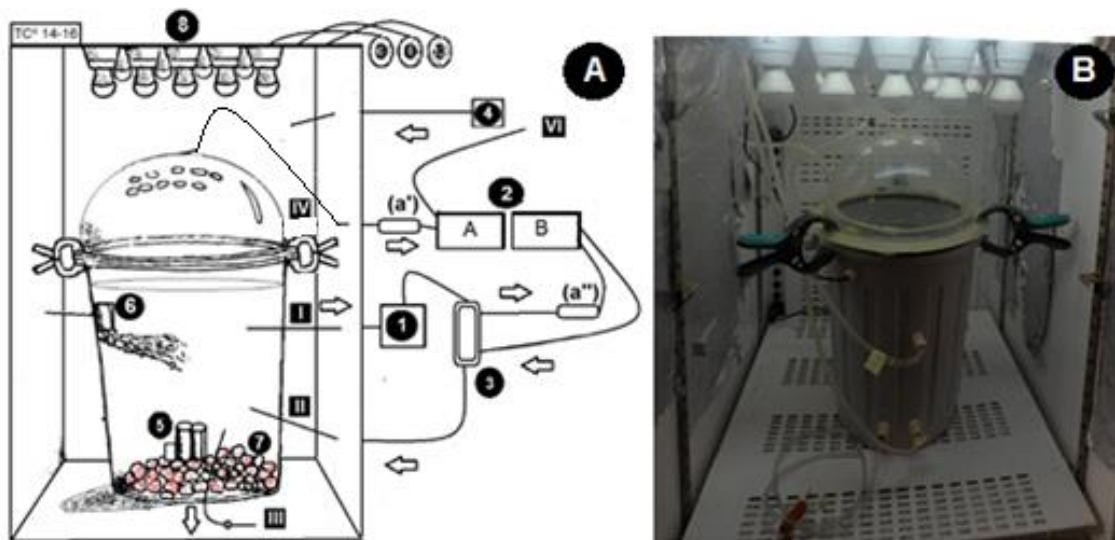


Figura 13 - Ilustração (A) e foto (B) do sistema de incubação e seus componentes, números algébricos indicam aparelhos e demais componentes, números romanos indicam as passagens da água e do ar; (a' e a'') indicam os desumidificadores ou drys.

A câmara para incubação foi alocada no interior do Fitoclima, o qual, mantinha uma temperatura interna de 14 à 16 °C.. O nosso fotobiorreator, possuía cinco passagens (**I**; **II**; **III**; **IV** e **V**), para fluxo de água e do ar. Dois tubos serviam como passagens para saída e entrada de água, na (figura 10 A) eles estão denominados como (**I**) e (**II**), o tubo (**I**) contava com o auxílio da bomba peristáltica (**1**), a qual, direcionava a água de dentro da câmara para medição de concentração do CO₂, através do IRGA (Infra Red Gás Analizator), denominado na (Figura 10 A) como (**2**). A passagem (**II**), era o local no qual a água analisada no IRGA (**2A**) retornava para dentro da câmara. Sem participação na circulação do sistema, um terceiro tubo para passagem de água, denominado na figura como (**III**), tinha como função a coleta de amostras da água, afim de medir, concentração de oxigênio, temperatura, e salinidade, antes e após cada incubação.

Como já mencionado, para que houvesse saída de água de dentro da câmara, através do tubo de passagem (**I**), para posterior análise no IRGA (**2A**), foi necessário a instalação de uma bomba peristáltica, indicada pelo número algébrico (**1**), esta bomba manteve a água em constante circulação, direcionando-a de dentro da câmara para fora pelo tubo (**I**), ao passar por este tubo, a água seguia em direção à uma coluna de trocas gasosas (Mini Module membrane contractor, Celgard, USA) (**3**), onde o ar era separado da água, após este processo, o ar, atravessava ainda por um desumidificador (dry), indicado na figura como (**a''**), e analisado no IRGA (**2B**), o qual, registrava a concentração do CO₂, em intervalos de 5

minutos. Após passar por esse processo, o ar era devolvido para (3), onde era misturado com a água advinda do tubo (I), a qual, passara através da coluna de trocas gasosas (3), após isso, a água retornava para a câmara pelo tubo (II).

O ar atmosférico de dentro da câmara era puxado pelo IRGA e direcionado para a saída (IV), então, seguia em direção ao desumidificador (dry) denominado na figura como (a'), posteriormente, este ar era analisado pelo IRGA A (2 A), onde, também registrava-se a concentração de CO₂ a cada 5 minutos, após ser analisado, o ar recolhido era direcionado para a saída (VI), onde o ar era devolvido ao ambiente.

Na figura, o número (5) indica os aparelhos utilizados para a medição de oxigênio da água oxímetrotemperatura da água através do termômetro (registrator de dados de temperatura / alarme HOBO Pendant® 64K - UA-001-64, ONSET ®) e radiômetro (Irradiance ODYSSEY - Sensor PAR, Odyssey Light logger), o qual, registrou a irradiância promovida pelo conjunto de 15 lâmpadas de LED indicadas no número (8), essa quantidade de lâmpadas resultava na variação 0 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (período escuro) até a média de 300 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (período mais claro), durante cada período de incubação. O sistema de iluminação contava com temporizadores, os quais, foram programados para ligarem de modo crescente, a primeira fileira com 5 lâmpadas, após algumas horas do início da incubação, após certo tempo a segunda fileira, também com 5 lâmpadas, era ativada, e por fim após 4 ou 6 horas do início da incubação, a terceira fileira, também com 5 lâmpadas era ativada, totalizando a média de 300 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ (período mais claro), após chegar o ápice de iluminação, a último conjunto de lâmpadas a ser ativado conforme programado no timer, era então desligado, após certo tempo o segundo conjunto de lâmpadas também desligava-se restando apenas o primeiro conjunto, que também desligava deixando o interior do fitoclima em escuridão total.

Ao encerrar as incubações, todos os dados registrados pelos aparelhos, eram recolhidos, com auxílio dos programas específicos de cada aparelho. Para o oxímetro o programa MiniDOT foi utilizado, afim de converter os dados registrados, os quais, foram plotados em tabelas do excel 2013, os dados do (IRGA) (EGM-4, PP Systems, Reino Unido), radiômetro (Irradiance ODYSSEY - Sensor PAR, Odyssey Light logger) e termômetro (registrator de dados de temperatura / alarme HOBO Pendant® 64K - UA-001-64, ONSET ®), seguiram o mesmo padrão, após a retirada dos dados de cada aparelho, estes eram reiniciados, antes do fechamento da câmara de incubação, e ativação do IRGA, o que marcava o início de cada nova incubação.

Para análise, pH, temperatura, oxigênio antes do início e do final de cada incubação, a água era recolhida através da saída (III), depositada em um recipiente de 200ml, posteriormente era analisada no pHmetro e no oxímetro portátil, então registrava-se os dados.

3.3.3 Incubações

Após a construção do sistema, seis incubações foram realizadas em um período de duas semanas. Todas as incubações tiveram o mesmo período de tempo ~24 horas, a única variação dentro do sistema foi o tempo de exposição à irradiância, já que em três incubações os rodolitos foram expostos a maior intensidade de irradiância (300 micromols) por maior período de tempo ~9 horas, estas incubações consideramos como incubações de fotoperíodo longo.

Nas outras três incubações, o período de tempo onde os rodolitos ficavam expostos a maior irradiância, fora de ~ 4 horas, estas incubações consideramos ser de fotoperíodo curto. Tais variações no período de tempo de maior exposição, foi obtido através da irradiância programada, o sistema nos permitiu comparar característica sazonal anual, na qual, os rodolitos estão submetidos em ambiente.

3.3.4 Análises estatísticas

Para todas as análises, primeiramente os dados foram sujeitos ao teste de normalidade e homogeneidade de variância (Teste de Cochran). A variação de CO₂ água e CO₂ ar, irradiâncias e O₂ tiveram seus dados submetidos em uma análise de variância (ANOVA) multifatorial, sendo realizado, em seguida, um teste de comparação múltipla de Student- Newman-Keuls. O intervalo de confiança e o nível de significância considerados foram de 95% e 5% ($p < 0,05$), respectivamente. As análises de variância foram realizadas no programa STATISTICA 7.0 (StatSoft, Inc.).

4 RESULTADOS

4.1 Resposta do sistema as incubações

As variações nas concentrações dos gases em detrimento as reações primárias dos rodolitos, sob a influência das diferentes irradiâncias nos quais os rodolitos foram submetidos,

foram registradas pelo sistema, onde o balanço de CO_2 entre os compartimentos ar e água foi comparado. A variação de fotoperíodo (dia curto – dia longo) programado no sistema, nos proporcionou respostas diferentes entre dia longo e dia curto. Diferente do dia curto no dia longo, houve maior decréscimo de CO_2 em ambos compartimentos, água e ar, bem como, produção de oxigênio por tempo mais prolongado em irradiância máxima.

O fotossistema registrou a diferença entre os fotoperíodos a partir do momento em que atingem $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, antes da luz desligar e iniciar o período escuro, durante o fotoperíodo curto, a produção de CO_2 em ambos os compartimentos tende a aumentar suavemente, enquanto que em dias longos a partir desse momento, o aumento. Tais resultados podem ser melhor visualizados nos gráficos da figura 12.

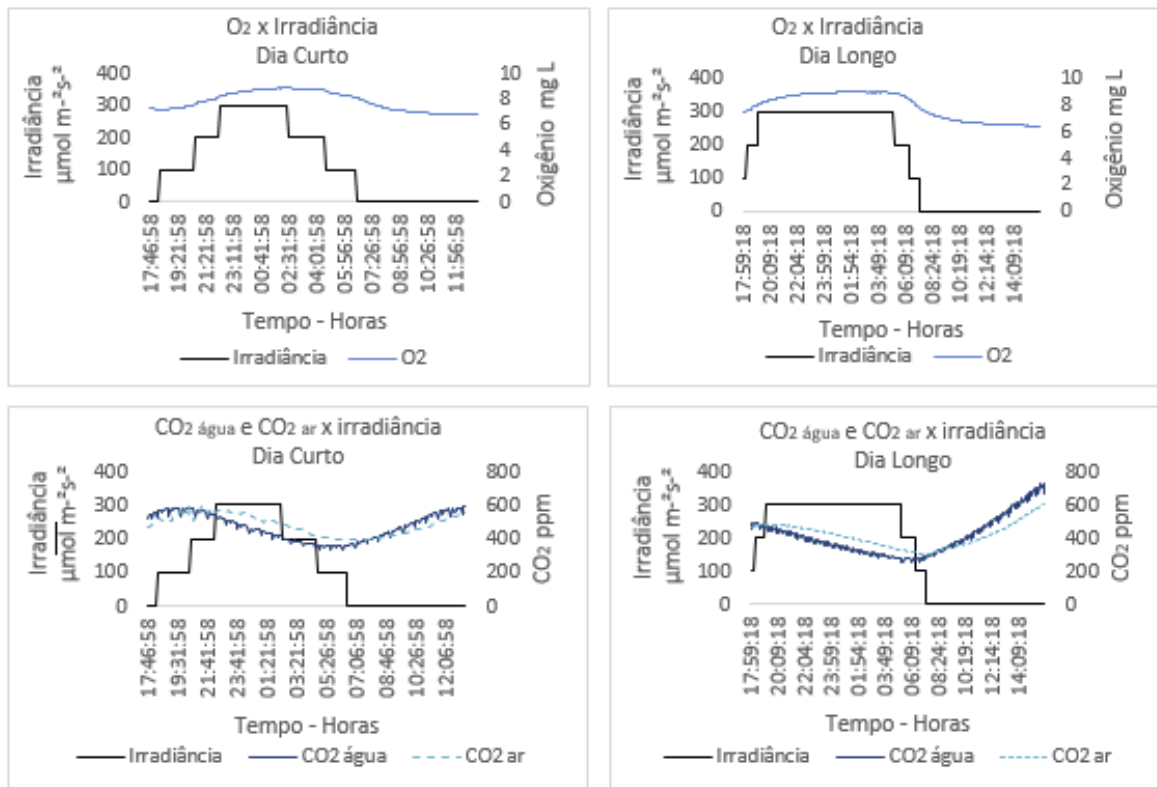


Figura 14 - Gráficos dos gases x irradiância para cada foto período (dia longo e dia curto)

4.2 Fluxo dos gases, consumo x produção e suas relações com as diferentes irradiâncias e diferentes fotoperíodos.

Os resultados obtidos pela ANOVA, nos permitiu comparar a produção e consumo de CO_2 sob influência das diferentes irradiâncias e distintos fotoperíodos, além disso a tabela com os

resultados para o O₂ em diferentes irradiâncias e diferentes fotoperíodos também foram plotados

Tabela 1– Resultados das análises de ANOVA bifatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis, as quais, são as concentrações de CO₂ na água e no ar, dependentes da Irradiância. Os efeitos significativos estão com os dados em negrito.

	SS	Grau de liberdade	MS	F	p
Irradiância	501,5125	3	167,1708	219,4117	0,000000
Fotoperíodo	14,5042	1	14,5042	19,0367	0,000020
CO2- atmosfera e água	90,0375	1	90,0375	118,1742	0,000000
Irradiância*Fotoperíodo	2,6125	3	0,8708	1,1430	0,332557
Irradiância*CO2 - ambiente	54,4792	3	18,1597	23,8346	0,000000
Fotoperíodo*CO2 ambiente	2,2042	1	2,2042	2,8930	0,090355
Irradiância*Fotoperíodo*CO2 ambiente	1,9792	3	0,6597	0,8659	0,459517

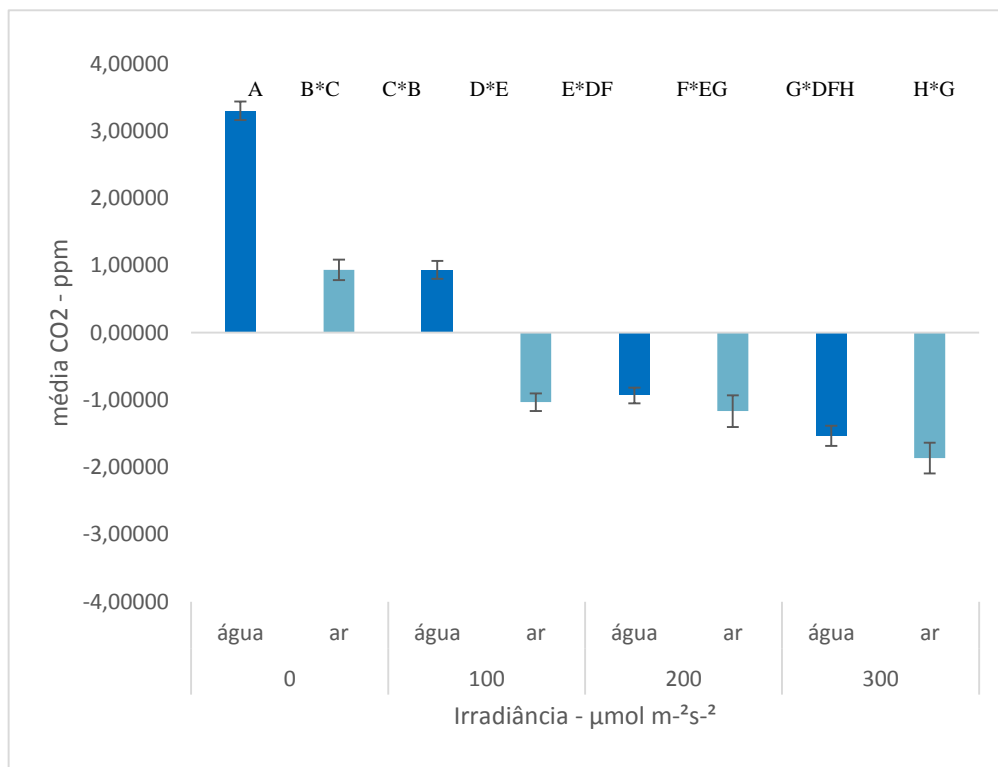


Figura 15 - Gráfico de colunas com os resultados obtidos pela ANOVA, cada coluna representa o valor das taxas médias de CO₂ presente no ar (azul claro) e na água (azul escuro) em função das diferentes irradiâncias. Cada coluna foi representada com uma letra de A à H.

Para a situação de 0 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ os valores positivos tanto da água quanto do ar indicam que está ocorrendo a liberação de CO_2 , nessa condição a variação média do CO_2 na água é de 3,30 ppm, enquanto que no ar, o valor dessa variação é de 0,93 ppm. A partir de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, o CO_2 da água reduz com diferença significativa ($p < 0,05$), em comparação à condição inicial a 0 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a média de produção do CO_2 água nesse momento é de 0,933 ppm. Nessa condição de irradiância, o ar possui diferença sob a condição anterior passando a uma média negativa -1,033.

Sob a condição 200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, os valores médios de CO_2 da água e do ar passam a ser negativos, tais valores indicam o decréscimo de CO_2 nos dois ambientes, ou seja, o balanço é negativo, consideramos que está ocorrendo o consumo de CO_2 do ambiente atmosférico e aquático. Em 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ a quantidade de CO_2 do ar, não apresenta diferença estatística, entretanto na condição de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ocorre diferença significativa para a água, onde a média passa a ser -0,933 ppm.

Na irradiância de 300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ocorre maior decréscimo de CO_2 em ambos ambientes, com diferença significativa para os resultados. Nessa irradiância a média do CO_2 água passa a ser -1,533 ppm, ou seja, decresceu em 0,6 ppm. Para o CO_2 ar a média tem resultado de -1,866 ppm, com decréscimo de -0,83 ppm.

Tabela 2 - Resultados das análises de ANOVA bifatorial para cada variável dependente, com efeitos isolados e combinados das variáveis dependentes, ou seja, oxigênio dependente de irradiância e fotoperíodo.

	SS	MS	F	p
Irradiância*O2	0,064419	0,021473	50,9914	0,000000
Fotoperíodo	0,007652	0,007652	18,1701	0,000029
Irradiância*Fotoperíodo	0,010727	0,003576	8,4909	0,000022

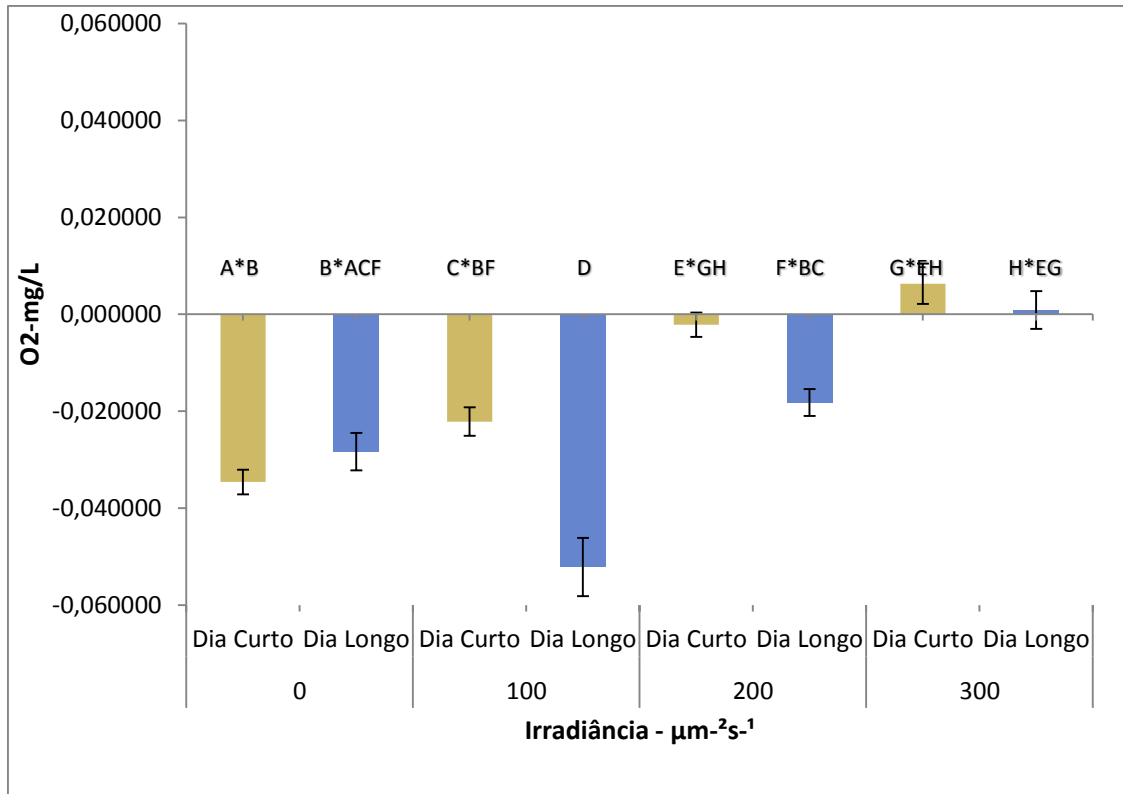


Figura 16 - Gráfico com os resultados obtidos pela ANOVA, cada coluna foi representada com uma letra, e representam os valores das taxas médias de O_2 na água em função dos diferentes fotoperíodos. Letras que se repetem em outras colunas indicam que não há significativas ($p > 0,05$) entre as colunas. A cor marrom representa dia curto e a cor azul escura dia longo.

As taxas de oxigênio do dia curto e dia longo a $0 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, não apresentam diferenças significativas ou seja $p < 0,05$, de $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ até $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ as taxas apresentam diferenças significativas entre si $p > 0,05$. Até $200 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ percebe que o sistema é um consumidor de oxigênio tanto para dias longos como dias curtos, passando a liberar oxigênio para o sistema somente a partir de $300 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

5 DISCUSSÃO

O fotobiorreator apresentou eficiência durante os testes, apesar de nossos resultados, encontramos limitações principalmente em comparações com outros estudos, principalmente por carência de caracterizações que tenham se baseado em sistemas que privilegiaram o acoplamento água/atmosfera.

Apesar disto, os resultados gerais demonstraram que os processos biológicos dos rodolitos influenciaram nos compartimentos água e ar. As incubações mostraram que os fluxos de CO₂ tanto da água como do ar, além da produção de oxigênio e seu consumo, estavam totalmente dependentes das condições de irradiâncias nas quais os rodolitos foram submetidos. Durante o aumento e diminuição de irradiância, o sistema documentou com eficiência as variações no balanço produção/consumo de oxigênio e dióxido de carbono, estes sob influência das respostas fisiológicas promovidas pelas algas calcárias.

A partir do momento que a irradiância atinge o patamar de 200 μmol m⁻²s⁻¹, a curva de CO₂ água e ar iniciou um decréscimo, apesar disso, nossos resultados não possuem um bom estudo comparativo, já que as respostas à diferentes irradiâncias recebida pelos rodolitos não são tão bem conhecidos (Birkett et al., 1998). Entretanto, este fator, e esta variação de irradiância que podem ter sido prejudicados, devido as características físicas da nossa câmara, foi a absorção de luz pelos rodolitos devido a opacidade do balde.

Assim, na condição de 200 μmol m⁻²s⁻¹ as variações de CO₂ da água passam a ser negativas, demonstrando que nessa situação o sistema absorve CO₂, porém, o consumo do CO₂ atmosférico permanece inalterado. Com a adição de mais irradiância, chegando ao patamar máximo de 300 μmol m⁻²s⁻¹, os rodolitos passaram a consumir mais CO₂, deixando o balanço de CO₂ ainda mais negativo em ambos sistemas.

Este resultado nos traz melhor certeza do papel dos rodolitos da Ria Formosa como captador do CO₂ já que no ambiente natural as irradiâncias podem chegar até próximo à ~700 μmol m⁻²s⁻¹ (Silva e Santos, 2003), assim, é necessário que novas avaliações considerem estes limites, isso permitirá trazer uma perspectiva mais clara do papel destes organismos no balanço de CO₂ para o sistema Ria Formosa. .

Para o oxigênio, foram observados taxas negativas de 0 μmol m⁻²s⁻¹ a 200 μmol m⁻²s⁻¹ (figura 16), tornando-se positiva somente a partir de 300 micromols. Tal resultado, nos mostra que apesar da irradiância recebida durante certo tempo pelos rodolitos, o sistema demorou produzir mais oxigênio do que consumia. Este resultado indica o metabolismo dos organismos presentes nos rodolitos, influenciam no sistema, visto que, as estruturas dos rodolitos são morfologicamente complexas e guardam uma biodiversidade associada importante e diversa, composta por microorganismos que representam grupos de produtores primários e também por heterótrofos (Santos, 2015).

Um ponto interessante a se observar, é o tempo de troca do CO₂ do ar com a água, onde o tempo de troca registrado pelo fotobiorreator, demonstrou que os rodolitos quando expostos a irradiância de 200 μmol m⁻²s⁻¹, ocasionam o decréscimo de CO₂ do ar rapidamente

em um período de 15 à 20 minutos, além disso, após ocorrer essa ação no ar, para a água ocorre quase que seguidamente ocorre o decréscimo de CO₂ da água.

Observamos que a funcionalidade do fotobiorreator, principalmente na sua função de isolamento do sistema com o ambiente externo, foi bem executada, a utilização da borracha de vedação nos limites entre a abertura da doma e a abertura do balde, funcionou corretamente, além, dos passa fios, que vedaram bem as saídas de ar e água. Tal resultado pode ser confirmado, pelo não registro de vazamentos e tão pouco, pelos registros dos dados do IRGA que mediu o CO₂ da atmosfera e da água não registrando variações fora do período luminoso.

A ferramenta construída e testada, vem a ser um a inovação para o auxílio de futuras análises biológicas, principalmente, aquelas que visam avaliar o balanço de CO₂ tanto da água como do ar, com o diferencial de análise concomitante dos ambientes pré-disponíveis. A análise com rodolitos, demonstrou que o sistema de fato é efetivo para observações das relações ecofisiológicas dos organismos com o meio, no qual, estes estão inseridos.

6 CONCLUSÃO

O sistema mostrou-se eficiente para avaliar a troca de CO₂ entre água e ar, além da produção de oxigênio, sob influência das diferentes irradiâncias, logo, os resultados apresentados, reforçam a importância de se preservar os ambientes nos quais se encontram os rodolitos, já que estes contribuem no serviço ambiental de ciclagem do CO₂ e na produção de oxigênio.

Entretanto o sistema precisa de melhorias pontuais para melhor caracterização desse serviço ambiental prestado pelos rodolitos, como sugestão, utilizar uma câmara totalmente transparente, proporcionaria uma penetração eficiente da luz, sobre a água de modo tridimensional que poderia ser melhor aproveitada pelos rodolitos, otimizando sua fotossíntese, além disso, equipar a câmara com oxímetro na parte atmosférica, permitiria comparar oxigênio aquoso e atmosférico, e assim registrar qual o balanço entre os dois ambientes.

REFERÊNCIAS

- Amado-Filho, G. M., Moura, R. L., Bastos, A. C., Salgado, L. T., Sumida, P. Y., Guth, A. Z., ... Thompson, F. L. (2012). Rhodolith beds are major CaCO₃ BIO-factories in the tropical south West Atlantic. *PLoS ONE*, 7(4), 5–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035171>
- Amancio, C. E. (2007). Precipitação de CaCO₃ em algas marinhas calcárias e balanço de CO₂ atmosférico: os depósitos calcários marinhos podem atuar como reservas planetárias de carbono? (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Beardal, J., & Raven, J. (2004). *z*, 43(January), 26–40.
- Bilan, M. I., & Usov, A. I. (2001). Polysaccharides of Calcareous Algae and Their Effect on the Calcification Process, 27(1), 2–16.
- Birkett, D. a. ., Maggs, C. a. ., Dring, M. J. ., Birkett D.A., Maggs C.A., & Dring M.J. (1998). An overview of dynamic and sensitivity characteristics for conservation management of marine SACs. *Scottish Association for Marine Science*, V(December 2013), 116pp. <https://doi.org/10.1111/anae.12641>
- Blunden, G., Campbell, S. A., Smith, J. R., Guiry, M. D., Hession, C. C., & Griffin, R. L. (1997). Chemical and physical characterization of calcified red algal deposits known as maerl, 11–17.
- Borowitzka, M. A. (1981). Photosynthesis and Calcification in the Articulated Coralline Red Algae, 23, 17–23.
- Bosence, D. W. J. (1983). The occurrence and ecology of recent Rhodoliths - A review. *Coated Grains.*, 225–242. https://doi.org/10.1007/978-3-642-68869-0_20
- Cao, L., Caldeira, K., & Jain, A. K. (n.d.). Effects of carbon dioxide and climate change on ocean acidification and carbonate mineral saturation. <https://doi.org/10.1029/2006GL028605>
- Chisholm, J. R. M. (2003). Primary productivity of reef-building crustose coralline algae, 48(July 1986), 1376–1387.
- Costanza, R. (1999). The ecological , economic , and social importance of the oceans, 31, 199–213.
- Foster, M. S. (2001). Rhodoliths: Between rocks and soft places. *Journal of Phycology*, 37(5), 659–667. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.00195.x>
- Frankignoulle, M., Gattuso, J. P., Biondo, R., Bourge, I., Copin-Montégut, G., & Pichon, M.

- (1996). Carbon fluxes in coral reefs. II. Eulerian study of inorganic carbon dynamics and measurement of air-sea CO₂ exchanges. *Marine Ecology Progress Series*, 145(1–3), 123–132. <https://doi.org/10.3354/meps145123>
- Gattuso, J. P., Pichon, M., Delesalle, B., Canon, C., & Frankignoulle, M. (1996). Carbon fluxes in coral reefs. I. Lagrangian measurement of community metabolism and resulting air-sea CO₂ disequilibrium. *Marine Ecology Progress Series*, 145(1–3), 109–121. <https://doi.org/10.3354/meps145109>
- Gran, G. (1988). Equivalence volumes in potentiometric titrations. *Analytica Chimica Acta*, 206(C), 111–123. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)80835-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)80835-1)
- Häder, D. P., Herrmann, H., Schäfer, J., & Santas, R. (1997). Photosynthetic fluorescence induction and oxygen production in two Mediterranean Cladophora species measured on site. *Aquatic Botany*, 56(3–4), 253–264. [https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(96\)01107-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3770(96)01107-2)
- Ishimatsu, A., Hayashi, M., Lee, K. S., Kikkawa, T., & Kita, J. (2005). Physiological effects on fishes in a high-CO₂ world. *Journal of Geophysical Research C: Oceans*, 110(9), 1–8. <https://doi.org/10.1029/2004JC002564>
- Kamenos, N. A., Moore, P. G., & Hall-Spencer, J. M. (2004). Nursery-area function of maerl grounds for juvenile queen scallops *Aequipecten opercularis* and other invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, 274(Idm), 183–189. <https://doi.org/10.3354/meps274183>
- Kühl, M., Glud, R. N., Borum, J., Roberts, R., & Rysgaard, S. (2001). Photosynthetic performance of surface-associated algae below sea ice as measured with a pulse-amplitude-modulated (PAM) fluorometer and O₂ microsensors. *Marine Ecology Progress Series*, 223(1), 1–14. <https://doi.org/10.3354/meps223001>
- Martin, S., Clavier, J., Chauvaud, L., & Thouzeau, G. (2007). Community metabolism in temperate maerl beds. II. Nutrient fluxes. *Mar Ecol Prog Ser*, 335, 31–41. <https://doi.org/10.3354/meps335031>
- Martin, S., & Hall-spencer, J. M. (2017). *Effects of Ocean Warming and Acidification on Rhodolith / Maerl Beds*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-29315-8>
- Martins, C. R., Pereira, P. A. de P., Lopes, W. A., & de Andrade, J. B. (2003). Ciclos Globais de Carbono, Nitrogênio e Enxofre: a Importância da Química da Atmosfera. *Comunicata Scientiae*, 1(2), 28–41.
- Noisette, F., Duong, G., Six, C., Davoult, D., & Martin, S. (2013). Effects of elevated pCO₂ on the metabolism of a temperate rhodolith *Lithothamnion corallioides* grown under

- different temperatures. *Journal of Phycology*, 49(4), 746–757.
<https://doi.org/10.1111/jpy.12085>
- Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., Bullister, J. L., ... Kozyr, A. (2004). The Oceanic Sink for Anthropogenic CO₂, 305(July), 367–372.
- Santos, E. A. X. D. (2015). Influência da morfologia sobre a macrofauna de invertebrados associada a rodólitos lisos e rugosos.
- Semesi, I. S., Kangwe, J., & Björk, M. (2009). Alterations in seawater pH and CO₂ affect calcification and photosynthesis in the tropical coralline alga, *Hydrolithon* sp. (Rhodophyta). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84(3), 337–341.
<https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.03.038>
- Silva, J., & Santos, R. (2003). Daily variation patterns in seagrass photosynthesis along a vertical gradient. *Marine Ecology Progress Series*, 257, 37–44.
- Silva, J., Feijóo, P., & Santos, R. (2008). Underwater measurements of carbon dioxide evolution in marine plant communities: A new method. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78(4), 827–830. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.02.019>
- Sournia, A. (1976). Oxygen metabolism of a fringing reef in French polynesia. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen*, 28(3–4), 401–410.
<https://doi.org/10.1007/BF01610589>
- Steneck, R. S. (1986). THE ECOLOGY OF CORALLINE ALGAL CRUSTS : Convergent Patterns and Adaptative Strategies, (18), 273–303.
- Takahashi, T., Sutherland, S. C., Wanninkhof, R., Sweeney, C., Feely, R. A., Chipman, D. W., ... de Baar, H. J. W. (2009). Climatological mean and decadal change in surface ocean pCO₂, and net sea-air CO₂ flux over the global oceans. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 56(8–10), 554–577.
<https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.12.009>

