

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE  
FUNGOS, ALGAS E PLANTAS

EFEITOS DAS VARIAÇÕES DE PH, TEMPERATURA E  
NUTRIENTES NA ECOFISIOLOGIA DE *Lithothamnion crispatum*  
Hauck (CORALLINALES, RHODOPHYTA) E *Sonderophycus*  
*capensis* (Montagne) M.J. Wynne (PEYSSONNELIALES,  
RHODOPHYTA): SUBSÍDIOS PARA O ENTENDIMENTO DAS  
MUDANÇAS CLIMÁTICAS.

Pamela Tamara Muñoz Muñoz

Orientador: Dr. Paulo Antunes Horta Junior  
Co-orientador: Dr. José Bonomi Baruffi

Florianópolis, 2013

Pamela Tamara Muñoz Muñoz

EFEITOS DAS VARIAÇÕES DE PH, TEMPERATURA E NUTRIENTES NA ECOFISIOLOGIA DE *Lithothamnion crispatum* Hauck (CORALLINALES, RHODOPHYTA) E *Sonderophycus capensis* (Montagne) M.J. Wynne (PEYSSONNELIALES, RHODOPHYTA): SUBSÍDIOS PARA O ENTENDIMENTO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS.

Effects of change in pH, temperature and nutrients in the ecophysiology of *Lithothamnion crispatum* Hauck (Corallinales, Rhodophyta) and *Sonderophycus capensis* (Montagne) M.J. Wynne (Peyssonneliales, Rhodophyta): contributions to the climate change understanding.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientador: Dr. Paulo Antunes Horta Junior

Co-orientador: Dr. José Bonomi Barufi

Florianópolis, 2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Munoz , Pamela  
EFEITOS DAS VARIAÇÕES DE PH, TEMPERATURA E NUTRIENTES NA  
ECOFISIOLOGIA DE *Lithothamnion crispatum* Hauck  
(CORALLINALES, RHODOPHYTA) E *Sonderophycus capensis*  
(Montagne) M.J. Wynne (PEYSSONNELIALES, RHODOPHYTA):  
SUBSÍDIOS PARA O ENTENDIMENTO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS /  
Pamela Munoz ; orientador, Paulo Horta ; co-orientador,  
José Bonomi. - Florianópolis, SC, 2013.  
54 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Inclui referências

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.  
Ecofisiologia . 3. Macroalgas . 4. Mudanças climática . 5.  
Brasil. I. Horta , Paulo. II. Bonomi, Jose . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

*Obrigada a todas aquelas pessoas conhecidas e desconhecidas que me ajudaram sem interesse nenhum a realizar este projeto de mestrado e para todas aquelas que me deram sua amizade, carinho e estiveram sempre comigo.*

## **Agradecimentos**

À minha família por estar sempre no meu lado apoiando todas minhas iniciativas, e especialmente meu pai que sempre teve confiança absoluta por mim. À minha irmã, por escutar-me nos momentos difíceis e de tensão. Quero agradecer à minha mãe por dar-me seu amor e amizade à distancia. Também quero dizer obrigada à minha amiga Maria Hernandez que foi super importante neste último período em Florianópolis, por dar-me sempre sua amizade, carinho e fazer-me tanto rir e alegrar minha vida “muchas gracias mari!”. Quero agradecer a Brezo Martinez por dar-me uma guia importante em minhas análises, não só como professora e pesquisadora senão que também como amiga, “sem ti Brezo ainda estaria perdida nas minhas análises” e agradecer a meus orientadores. Agradecer também ao Eduardo Bastos por ajudar-me com a ideia e construir o microcosmos. Agradecer a CNPq, CAPES (PNADB) e INCT-MCs. Finalmente, quero agradecer a todas aquelas pessoas que atuaram neste processo e que talvez estou esquecendo neste momentos, aquelas que me ajudaram fazer análises, coletas e na construção do meu projeto.....muito obrigada.

*Acredite em si próprio e chegará um dia em que os  
outros não terão outra escolha senão acreditar com  
você.*

*(Cynthia Kersey)*

## Resumo

No presente trabalho se avaliou a interação das variações do pH, temperatura e nutrientes a partir de níveis locais atuais destes fatores, no desempenho fisiológico de duas espécies de algas calcárias com diferenças de distribuição e afinidades ecofisiológicas. *Sonderophycus capensis* é uma espécie típica de ambientes temperados frios, enquanto que *Lithothamnion crispatum* é uma espécie de ambientes tropicais. A partir de experimentos feitos em microcosmo, a temperatura se mostrou o principal fator que levou às alterações da fisiologia dessas algas. As taxas de transporte de elétrons (ETR) diminuíram drasticamente nos tratamentos que se encontravam em elevada temperatura nas duas espécies. Adicionalmente, no tratamento que se encontrava em temperatura elevada, o baixo pH (7,2) manteve a ETR constante, atuando o pH de forma aditiva e antagonista com a temperatura. Com relação à calcificação, o pH baixo (7,2)/injeção de CO<sub>2</sub> atuou de forma aditiva, estimulando a descalcificação na mesma forma nas duas espécies. Por outro lado, a elevada temperatura beneficiou a calcificação, chegando até 51% de calcificação em condições de pH controle. A interação também foi observada entre a temperatura e o pH, beneficiando levemente a calcificação. Em outro sentido, foram tomadas amostras de água e analisadas, com o fim de observar se existiam mudanças nas espécies de carbonato. Desta forma, a concentração do íon carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) foi menor nos tratamentos com baixo pH, assim como também as saturações de calcita e aragonita. Na maior parte das análises feitas nas duas espécies, os fatores mais importantes foram temperatura e pH, atuando de forma aditiva ou sinérgica. Por sua vez, os nutrientes não tiveram grande influência na fisiologia. Apesar das diferenças na distribuição das duas espécies, não se observaram grandes diferenças nas respostas fisiológicas delas ao ser submetidas a variações de temperatura, pH e nutrientes. Em futuros experimentos, a aplicação dos fatores já mencionados por maiores períodos de tempo poderia contribuir para entender de melhor forma as implicações na ecofisiologia das espécies calcificadas.

**Palavras-chave:** *Sonderophycus capensis*, *Lithothamnion crispatum*, temperatura, pH, nutrientes, interação.

## Abstract

In the present work it is evaluated the interaction effect of changes in pH, temperature and nutrients with current local levels each one of factors on the physiological performance of two species of calcareous algae with differences of distribution and eco physiological affinities. *Sonderophycus capensis* represents a group of species typical of temperate cold environments, whereas *Lithothamnion crispatum* are species typical of tropical environments. From the analysis in microcosm, the temperature was seen to be main factor driving the alterations on the physiology of both models. ETR quickly decreased when it was in high temperature. Furthermore, a low pH (7,2) also acted in an additive and antagonistic way, increasing the ETR in the treatments at elevated temperature. Concerning the calcification, the injection of CO<sub>2</sub> and the low pH modified the calcification percentages, being lower in those treatments kept at low pH in both species. Nevertheless, the temperature favored calcification, being up to 51% higher in pH controlled conditions. Interaction on the calcification was also observed between temperature and pH, slightly increasing the calcification at elevated temperatures. The effects of decreasing pH were also observed on the chemistry of water. For it, the concentration of carbonate ions (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) was lower in those treatments at low pH. The saturation values of calcite and aragonite were also lower at low pH. In most of the analyses for both species the main driving factors were the temperature and the pH, acting in a synergetic or additive way in most of the cases. Nutrients did not have a big influence on the physiology. In spite of the differences on distribution of both species, no differences in physiological response were observed under the applied stresses. Future experiments conducted for longer periods of time could aid to better understand the eco physiological implicancies on these calcareous species.

**Keywords:** *Sonderophycus capensis*, *Lithothamnion crispatum*, temperature, pH, nutrients, interaction.



## **Lista de Tabelas**

### **Materiais e Métodos**

**Tabela 1:** Valores das concentrações de nutrientes de um ambiente controle (atual) e hipertrófico (futuro) que se utilizaram durante os experimentos. Foram utilizadas as mesmas fontes de nutrientes que as mencionadas por Martinez & Rico (2004) .....26

### **Resultados**

**Tabela 2:** Concentrações das espécies de carbono, ademais de tipos de carbonatos de cálcio como calcita (ca) e aragonita (ar), analisadas de amostras de água do mar extraídas no final do experimento e que encontravam sob os tratamentos. Os níveis de cada fator se encontram sinalados na tabela.....32

**Tabela 3:** ANOVA fatorial dos efeitos da temperatura, carbono e nutrientes depois do período de tempo 5 h da ETR ( $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em *Lithothamnion crispatum* e *Sonderophycus capensis*. \* para conseguir homogeneidade de variâncias foi substituído 1 outlier pela média do grupo ( $df = 47$ ) .....40

**Tabela 4:** ANOVAs dos efeitos da temperatura, carbono e nutrientes e sua combinação sobre a calcificação na espécie de rodolito *Lithothamnion crispatum* e *Sonderophycus capensis*.....43

## Lista de Figuras.

### Materiais e Métodos

**Figura 1:** Desenho esquemático do experimento com sistema de circulação de água aberto feito numa câmara de ambiente (25°C) constante em cor cinza. As linhas pretas e azuis representam a rede de água que começava desde o tanque de 5000 L que derivava a dois galões de 50 L que alimentavam de água os frascos de 1 L. Os frascos (unidades experimentais) de cor azul se encontravam situados sobre uma mesa de gradiente de temperatura representado em cor cinza com linhas na figura. As setas azuis indicam o sentido da circulação da água. Os nutrientes estão representados por retângulos de cor celeste e que eram injetados a uma das mangueiras em cor azul. Finalmente para reduzir o pH, foi injetado CO<sub>2</sub>, representando o cilindro de CO<sub>2</sub> com um círculo celeste, a um galão de 50 L .....24

**Figura 2:** Acessórios utilizados no preparo do experimento feito no laboratório. **(a)** Galões de 50L com injeção de CO<sub>2</sub> (1) e sem injeção (2) conectado ao controlador de pH (Weipro pH Controller –pH-2010) no extremo superior esquerdo (3). O eletrodo do controlador de pH (5) foi inserido no cano de saída da água do mar do galão com injeção de CO<sub>2</sub> (1). Na parte inferior esquerda, o cilindro de CO<sub>2</sub> conectado com o solenoide (6) controladora da saída de CO<sub>2</sub> (4). **(b)** Disposição das unidades experimentais (frascos) na mesa de gradiente de temperatura. ....25

### Resultados

**Figura 3:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle sob a alcalinidade **(a)** e do íon HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> **(b)** na água do mar coletada de cada um dos tratamentos. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão. Não se encontraram diferenças significativas entre os tratamentos. ....33

**Figura 4:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle sob saturação de calcita e aragonita **(a)** e do íon CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> **(b)** na água do mar coletada de cada um dos tratamentos. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão. As letras sobre as barras representam as significativas entre os tratamentos, segundo o teste a posteriori (SNK). ....34

**Figura 5:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle (c) sobre a ETR de *Lithothamnion crispatum*. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos dados. ....37

**Figura 6:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle (c) sobre a ETR de *Sonderophycus capensis*. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.....39

**Figura 7:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle (c) sobre *Lithothamnion crispatum* (**a**) e *Sonderophycus capensis* (**b**). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças significativas entre os tratamentos, segundo o teste a posteriori (SNK). ....42

## SUMÁRIO

1. <i>Introdução</i> .....	13
2. Hipóteses .....	21
3. Objetivo geral .....	21
4. Objetivos específicos .....	21
5. Materiais e Métodos .....	22
5.1. Área de coleta e Tratamento do material .....	22
5.2. Desenho Experimental .....	22
5.3. Análise de nutrientes .....	26
5.4. Alcalinidade .....	26
5.5. Medições da fotossíntese por meio da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	27
5.6. Calcificação .....	28
5.7. Análises Estatísticas .....	29
6. Resultados .....	30
6.1 Alcalinidade .....	31
6.2. Fluorescência .....	35
6.2.1 Taxa de transporte de elétrons (ETR) .....	35
6.3. Calcificação .....	41
7. Discussão .....	44
8. Referências .....	51



## *1. Introdução*

As mudanças no clima tem sido observadas ao redor de todo o planeta. Este processo está fortemente relacionado com o aumento na concentração dos gases estufa (dióxido de carbono, metano e óxido nitroso) e aerossóis, que afetam o balanço de energia do nosso sistema climático (IPCC 2007, Richardson 2008; Shi et al. 2010). Este incremento de gases começou aproximadamente em 1850, como consequência do aumento das atividades antropogênicas relacionadas ao processo de industrialização da Europa (Kug et al. 2010; Nordell 2003; Schuldt et al. 2011; Shi et al. 2010), tendo como resultado o processo de aquecimento da atmosfera a partir da metade do século XX (Kug et al. 2010). Este aumento da temperatura no planeta, em média tem oscilado entre 0,4 e 0,8 °C e teve uma aceleração nas últimas décadas (Kug et al. 2010). O processo crescente do consumo de recursos naturais tem produzido adicionalmente, uma série de outros poluentes que impactam localmente os mais diferentes ecossistemas (Steffen et al. 2012). Este grupo de fatores isoladamente ou em conjunto pode estar alterando o comportamento e/ou o desempenho fisiológico de animais e plantas nos ecossistemas terrestres ou aquáticos (Wernberg et al. 2012).

Desta forma, é importante ressaltar que a atmosfera e a superfície do oceano estão estreitamente relacionadas e que as mudanças ambientais que ocorrem na superfície terrestre, observadas ao longo dos anos, agora também podem ser percebidas nos oceanos. Estes ambientes podem absorver entre 70 e 80% do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) atmosférico (Reynaud et al. 2003). Portanto, o incremento na concentração de  $\text{CO}_2$  aéreo tem efeitos na química da água do mar, causando redução do pH, acidificando a água, e alterando a concentração do carbono inorgânico dissolvido (CID). Este incremento de  $\text{CO}_2$  aéreo é acompanhado pela elevação das concentrações de  $\text{CO}_2$  dissolvido na água do mar, um pequeno incremento do bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e de uma redução da concentração do íon carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Cornwall et al. 2012; Fabry et al. 2008; Tyrrell 2008; Wu et al. 2008). Quando o oceano se encontra em equilíbrio, o pH varia entre 7,8 a 8,2. Dessa forma, num pH de 8,2 na água de mar, o CID pode ser encontrado nas seguintes porcentagens: 88% de  $\text{HCO}_3^-$ , 11% de  $\text{CO}_3^{2-}$  e 0,5% na forma de dióxido de carbono aquoso ( $\text{CO}_{2\text{aq}}$ ) (Fabry et al. 2008). Consequentemente, qualquer alteração no pH por efeito do aumento  $\text{CO}_2$  atmosférico resulta num desequilíbrio químico na água do mar.

Assim, quando acontece a acidificação por efeito do aumento de  $\text{CO}_2$ , os oceanos buscam a estabilização química, sendo observada a descalcificação dos organismos que apresentam esqueleto calcário (Hall-Spencer et al. 2008). Estes organismos calcificados (com  $\text{CaCO}_3$ ) atuam como tampões (buffer), já que liberam íons  $\text{CO}_3^{2-}$  que se ligam com os prótons livres de  $\text{H}^+$ , formando  $\text{HCO}_3^-$ , desta forma neutralizando o processo de acidificação (Basso 2012; Doney et al. 2009; Sabine & Tanhua 2010). As predições dizem que no futuro o  $\text{CO}_2$  na água do mar, aumentará 192% e o  $\text{HCO}_3^-$  aumentará 14% pela ação de descalcificação (Roleda et al. 2012). Estas mudanças químicas resultariam em sérios problemas para os organismos calcificados, tanto animais como algas, uma vez que estes organismos tradicionalmente têm uma reduzida habilidade de manter e/ou renovar seu esqueleto calcário (Cornwall et al. 2012; Fabry et al. 2008; Johnson et al. 2012; Hurd et al. 2009; Jokiel et al. 2008; Russell et al. 2009; Semesi et al. 2009; Tyrrell 2008). Apesar de se predizer que a taxa de saturação de  $\text{CaCO}_3$  dos organismos calcários diminuirá 60% no fim deste século, este processo é dependente de particularidades da fisiologia e mineralogia nos diferentes grupos taxonômicos e da interação deste fator com outros determinantes do comportamento ecofisiológico dos organismos aquáticos (Rodolfo-Metalpa et al. 2009). O  $\text{CaCO}_3$  se encontra no esqueleto de invertebrados marinhos, incluindo corais, foraminíferos, cocolitoforídeos e algas calcárias (Diaz- Pulido et al. 2012; Jury et al. 2010). As duas formas cristalográficas dos carbonatos, a calcita e a aragonita, apresentam diferentes solubilidades, em função dos teores de Ca e Mg presentes em suas moléculas. Assim, quão maior a concentração de Mg maior a solubilidade do carbonato (Basso 2012; Diaz- Pulido et al. 2012; Smith et al. 2012). Desta forma, em ambientes acidificados, a calcita que tradicionalmente contém relativamente mais Mg em sua composição (de 8-12% de seu peso) é mais solúvel que a aragonita, e portanto, mais sensível a estes meios de pH reduzidos (Basso 2012; Smith et al. 2012).

Além do acima descrito, a acidificação dos oceanos poder ter outros efeitos no futuro da fisiologia dos organismos e também graves implicações ecológicas. Assim, para muitos organismos marinhos fotossintetizantes, as mudanças do  $\text{CO}_2$  nos processos biogeoquímicos do carbono alteram profundamente seu metabolismo, tanto de forma negativa como positiva (Boyce et al. 2010; Shi et al. 2010). Por exemplo, no fitoplâncton, o aumento do  $\text{CO}_2$  pode produzir grandes mudanças fisiológicas, como a diminuição da afinidade da RUBISCO

pelo CO<sub>2</sub> e uma consequente maior necessidade de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese (Wu et al. 2008). Porém, em organismos calcificados como cocolitoforídeos (*Emiliana huxleyi*) a resposta é diferente, já que com o aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> há também aumento da fotossíntese (Wu et al. 2008). Da mesma forma, no caso da alga parda calcificada *Padina pavonica*, se observou que ao aumentar a concentração de CO<sub>2</sub>, reduzia-se a calcificação, mas havia um aumento dos pigmentos Chl *a* e Chl *c* o que pode ter como resultado o aumento da capacidade fotossintética dessa alga (Jonhson et al. 2012). Em espécies de algas verdes calcificadas como o gênero *Halimeda*, Sinutok et al. (2012) sugerem que a diminuição do pH conduz a uma descalcificação ao mesmo tempo que uma diminuição da fotossíntese após 5 semanas de experimento. Assim, estes autores sugerem que estas duas condições fisiológicas estão estreitamente ligadas (Sinutok et al. 2012). Da mesma maneira, em estudos feitos em *Corallina pilulifera*, Gao et al. (1993) propuseram que a calcificação podia ser pH-dependente e que ao diminuir a um pH de 7,6, através de borbulhamento de CO<sub>2</sub> em um ambiente controlado, a calcificação também diminuía. Em outras espécies incluindo rodolitos o comprometimento do metabolismo foi igualmente observado. Assim, a alga *Hydrolithon* sp. apresentou uma redução da calcificação da ordem de 20% em um meio acidificado de 7,6, mas aumentando a fotossíntese em 13% (Semese et al. 2009). Além disto, estudos feitos por Porzio et al. (2011) demonstraram uma perda de 25% da diversidade de algas calcárias em ambientes naturalmente acidificados no litoral italiano. Estas alterações na estrutura das comunidades fitobênticas destes ambientes acidificados, reforçam a hipótese de que estas diferentes susceptibilidades ecofisiológicas de grupos taxonômicos distintos devem resultar nas próximas décadas em profundas alterações na fisionomia destes ambientes bênticos.

Em outro sentido, tratando da temperatura, fator determinante das respostas fisiológicas, a sua elevação já mencionada na atmosfera é gradualmente transferida para o meio marinho (Bernhardt & Leslie 2013; IPCC 2007). Desde 1961, têm sido realizadas medições da temperatura na atmosfera, através de balão e satélite, mas um aumento significativo começou a ser notado na década de 80, tendo influência tanto na superfície terrestre como nos oceanos (IPCC 2007). Consequentemente, a temperatura média do oceano global aumentou até uma profundidade de pelo menos 3000 m, absorvendo até 80% do calor gerado na superfície terrestre (IPCC 2007).



Este aquecimento da água pode resultar em diferentes respostas dos organismos que vivem nas áreas mais rasas. Segundo Richardson (2010), no fitoplâncton o aquecimento afetaria a estrutura das comunidades, as alternâncias naturais dos respectivos ciclos de vida e sua fenologia. Todas estas alterações teriam impacto decisivo na promoção de mudanças na distribuição das populações, fazendo com que populações tipicamente tropicais cheguem a maiores latitudes, por exemplo. Em macroalgas estas alterações seriam as mais diversas. No caso de algas verdes, como *Ulva* spp., o aumento da temperatura promove o aumento do crescimento de maneira geral (Luo et al. 2012). As macroalgas vermelhas como *Gracilaria* spp. podem ser altamente tolerantes às altas temperaturas (até 30°C), apresentando aumentos do 4% na taxa de crescimento (Choi et al. 2006).

Por outro lado, em organismos calcificados como corais da espécie *Turbinaria mesenterina*, se observaram mortalidades de até 16,7%, quando os mesmos foram expostos à alta temperatura (31°C) (Faxneld et al. 2010). Na alga vermelha *Porolithon onkodes*, uma espécie crostosa calcificada, o aumento de CO<sub>2</sub> causou uma alta mortalidade e necrose só quando a mesma foi submetida a altas temperaturas, ou seja, maiores que 28°C sendo este o fator limitante (Diaz-Pulido et al. 2012). Em experimentos sob ambiente controlado, feitos por Martin & Gattuso (2009) no Mediterrâneo com a alga crostosa corallínea *Lithophyllum cabiochiae*, observou-se o efeito independente da temperatura, obtendo-se maior mortalidade, necrose e dissolução do esqueleto calcário, em alta temperatura. Assim, o aumento excessivo da temperatura, especialmente nas áreas mais rasas, resulta de maneira geral no comprometimento do metabolismo de algas calcárias, como o observado por Lathan (2008) que registrou o branqueamento ou degradação dos pigmentos fotossintéticos e consequente redução da capacidade fotossintética de *Corallina officinalis*, alga calcária articulada amplamente distribuída (Lathan 2008).

Boa parte das informações geradas relacionadas diretamente com mudanças climáticas tem tratado dos aspectos relacionados aos dois fatores citados inicialmente, acidificação e elevação de temperatura (Wernberg et al. 2012). Mas um efeito indireto das mudanças na temperatura, por exemplo, é o aumento nas precipitações em algumas áreas (Faxneld et al. 2010), como o previsto para a região centro sul da América do Sul (IPCC 2007). Uma maior quantidade de precipitações aumenta o carregamento de nutrientes de ambientes urbanos e rurais, fertilizando ainda mais as áreas costeiras (Faxneld et al. 2010; Viaroli et al. 2005). Além disso, atualmente o crescimento da população humana e

o uso das áreas costeiras representa a principal fonte de enriquecimento do meio marinho, resultado do aumento de descargas de esgoto (Halpern et al. 2012; Luo et al. 2012; Teichberg et al. 2010) e alteração na estrutura das comunidades fitobênticas de ambientes urbanizados (Martins et al. 2012). O papel da elevação dos nutrientes dissolvidos nestes ambientes passa a ser extremamente importante. Esse aumento na disponibilidade de nutrientes é chamado eutrofização, e que é definido por Duarte et al. (2009) como o incremento de matéria orgânica em ambientes aquáticos. Outra definição mais complexa desse termo foi dada por Andersen et al. (2006) que define o fenômeno como aquele caracterizado pelo enriquecimento da água por nutrientes, especialmente nitrogênio e/ou fósforo e matéria orgânica, causando um incremento do crescimento das algas e de plantas, produzindo diferenças na estrutura, função e estabilidade dos organismos e também na qualidade da água.

Assim, com a influência antropogênica se poderia esperar uma modificação das fontes de nutrientes, sua disponibilidade e a tipificação dos principais grupos de nutrientes nos oceanos (Zehr & Kudela 2011). O nitrogênio inorgânico, na forma de nitrato, e o fosfato são os dois nutrientes limitantes mais importantes para crescimento de macroalgas (Martinez & Rico 2004) e são os que conseqüentemente promovem as florações excessivas de macroalgas (Teichberg et al. 2010; Viaroli et al. 2005). Assim, o nitrogênio e fósforo são considerados os nutrientes limitantes para a bioacumulação de biomassa e a produtividade dos ecossistemas marinhos (Zehr & Kudela 2011). O crescimento de espécies oportunistas como *Ulva* é altamente favorecido com o aumento de compostos que contêm nitrogênio, como nitrato e N-amoniaco e fosfato (Luo et al. 2012). Além disso, as florações de macroalgas tem muitos efeitos negativos como sua acumulação de matéria orgânica nas praias, e além disso produz drásticas mudanças, reestruturando as comunidades naturais e a função dos ecossistemas (Teichberg et al. 2010). Russell et al. (2009) observou que os tapetes de macroalgas filamentosas são altamente favorecidos pelo aumento de nutrientes, favorecendo a porcentagem de cobertura e a fotossíntese. Por outro lado, em espécies perenes como *Sargassum stenophyllum*, o aumento da concentração de nutrientes, como amônia, não favorece a mesma, já que se provocou uma diminuição da fotossíntese desta espécie em benefício do crescimento de espécies oportunistas como *Ulva lactuca* (Schermer et al. 2012).

Existem diferentes abordagens de como as interações dos fatores podem ser tratadas. Estes efeitos podem ser abordados de forma isolada ou a avaliação dos efeitos de mais de um fator por vez. Quando

são abordados de forma isolada, isso implica que os fatores aplicados de forma independente sobre os organismos. No caso da avaliação de mais de um fator, estes podem analisados de formas: (1) sinérgica, que ocorre quando os fatores tem efeitos multiplicativos sobre os organismos; (2) aditiva, quando os fatores tem um efeito somatório sobre os organismos; e (3) antagonônica, quando os efeitos de diferentes fatores são anulados entre si. A maioria dos estudos se enfoca nos efeitos isolados dos fatores, embora recentemente tenham aumentado os estudos que contemplam mais que um fator apenas, simulando de melhor forma os ambientes naturais. De esta forma, os maiores impactos já identificados nos organismos têm sido observados quando os fatores são aplicados em conjunto e atuam de maneira sinérgica, tal como se poderia observar no futuro nos ambientes naturais (Wernberg et al. 2012)

Alguns exemplos de sinergia são dados por Russell et al. (2009), que observaram o efeito sinérgico do CO<sub>2</sub> e nutrientes em parâmetros como fotossíntese e cobertura, comprometendo o desempenho de algas calcárias e favorecendo, quando combinados, o desempenho de algas filamentosas. Outro exemplo em que os fatores combinados têm um maior impacto nas algas foi dado por Gao & Zheng (2010), em que a radiação ultravioleta (UV) e a acidificação atuam sinérgicamente reduzindo a fotossíntese, a calcificação, a captura de luz pelos pigmentos, o crescimento e incrementando a ação fotoprotetiva da alga *Corallina sesilis*. Enquanto isso, Martin & Gattuso (2009) observaram uma sinergia entre os fatores CO<sub>2</sub> e temperatura em que o aumento de CO<sub>2</sub> e temperatura afetaram drasticamente a calcificação do esqueleto da alga crostosa *Lithophyllum cabiochiae*. Os autores sugerem que a descalcificação por aumento de CO<sub>2</sub>, faz com as algas se tornem mais sensíveis ao aumento da temperatura. Outro exemplo de sinergia foi observado por Rodolfo-Metalpa (2011), que descreveu mortalidades de 50 a 80% quando níveis de pHs baixos (7,1-7,2) foram combinados com altas temperaturas (>28°C). Diaz-Pulido et al. (2012) observaram uma maior necrose e mortalidade da alga *Porolithon onkodes* apenas quando esta esteve tratada sob baixo pH e alta temperatura, evidenciando a forte interação entre estes fatores.

No presente estudo foram utilizadas duas espécies de algas calcárias: *Lithothamnion crispatum* Hauck e *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne. As macroalgas e especificamente as algas calcárias são componentes dominantes nas áreas costeiras e constituem o habitat para diferentes espécies, tanto para peixes, invertebrados assim como

para outras algas. Por serem espécies chave, fonte de substrato, de abrigo, de sedimento e alimento de muitos organismos, qualquer alteração na sua sobrevivência, crescimento ou habilidade competitiva poderia alterar o funcionamento e composição de todo o sistema (Cornwall et al. 2012, Hurd et al 2009).

*Lithothamnion crispatum* Hauck é uma espécie de alga calcária não articulada que cresce sob a forma livre sobre o substrato conhecida como rodolito. Estas algas vermelhas formam bancos extensos que ocorrem desde água rasas até águas mais profundas chegando a 150 m de profundidade (Pascelli et al. 2013; Riul et al. 2009; Teichert et al. 2012). Estes ambientes são considerados a maior fonte de carbonatos e micronutrientes do planeta, transformando fundos homogêneos de sedimento suave em fundos heterogêneos e duros criando um habitat para inestimável biodiversidade (Amado-Filho et al. 2007, 2012; Foster 2001; Riul et al. 2009; Teichert et al. 2012). No Atlântico sul, os bancos de rodolitos têm distribuição coincidente com a distribuição da espécie anteriormente citada ocorrendo desde o nordeste ao sul do Brasil (Riul et al. 2008). Além de amplamente distribuída, esta espécie é muitas vezes dominante como na região sul do Brasil (Pascelli et al. 2013). Desta forma pode-se teorizar que a espécie em questão suporta ampla variação de temperatura por estar presente em uma gradiente de temperatura que varia no ambiente entre 28 a 15 °C.

Por outro lado, *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne, outra alga que apresenta depósito de carbonatos em seu talo, tem sua distribuição limitada no Atlântico ao litoral sul e sudeste do Brasil, área onde a temperatura da água de fundo varia de 15 a 22 °C graus (Horta com. Pers.). Esta espécie, assim como a formadora de rodolitos, cria bancos extensos em sua área de ocorrência (Horta et al. 2008), fornecendo abrigo, substrato e alimento para diversidade biológica importante ecológica e economicamente. Estas espécies pertencem a ordens diferentes e tem maneiras distintas de depositar os carbonatos. As Corallinales, ordem que é representada pelo gênero *Lithothamnion* depositam o carbonato em suas paredes sob a forma de calcita que chega a representar 80-90% de seu peso seco. Deste carbonato 11% é de  $MgCO_3$  (Smith et al. 2012). *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne pertence à ordem das Peyssonneliales que acumulam carbonatos sob a forma de cristais extracelulares de aragonita (Smith et al. 2012).

Considerando a amplitude de distribuição das duas espécies e seus mecanismos distintos de deposição dos carbonatos, o estudo de sua fisiologia pode fornecer importantes subsídios de como grupos com diferentes estratégias adaptativas podem responder aos fatores relacionados às mudanças no clima e às mudanças de fatores locais representados pelo incremento de nutrientes. Apesar da importância ecológica destas espécies nos sistemas marinhos, já descrita acima, até agora ainda não foram publicados estudos dos efeitos das mudanças climáticas usando três fatores, tais como pH, temperatura e nutrientes na ecofisiologia destes organismos na costa do Brasil.

Neste trabalho, simularam-se ambientes com diferentes fatores relacionados às mudanças climáticas por meio de um microcosmos desenvolvido em laboratório. Assim, reproduzimos um ambiente simulando condições futuras de pH, temperatura e nutrientes. Nestas condições, se avaliaram os efeitos fisiológicos das algas calcificadas *Lithothamnion crispatum* Hauck (rodolito) e *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne, considerando diferentes combinações dos fatores mencionados anteriormente.

## 2. Hipóteses

2.1. *Lithothamnion crispatum* Hauck, por estar presente em áreas mais quentes deve ser mais resistente a maiores temperaturas que *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne.

2.2. *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne é mais resistente a pH mais baixo que *Lithothamnion crispatum* Hauck.

2.4. A interação dos três fatores deve comprometer de forma sinérgica e negativa a fisiologia de ambas as espécies.

## 3. Objetivo geral

3.1. Avaliar as mudanças fisiológicas de *Lithothamnion crispatum* Hauck e *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne em microscosmos com diferentes combinações de pH, temperatura e nutrientes.

## 4. Objetivos específicos

4.1. Avaliar o papel da interação dos fatores temperatura, pH e nutrientes na fotossíntese das algas *Lithothamnion crispatum* Hauck e *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne, por meio da fluorescência *in vivo* da clorofila *a*.

4.2. Avaliar o papel da interação dos fatores temperatura, pH e nutrientes na química da água e na calcificação de *Lithothamnion crispatum* Hauck e *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne.

## 5. Materiais e Métodos

### 5.1. Área de coleta e tratamento do material

As algas em estudo foram coletadas em dois lugares diferentes. O rodolito *Lithothamnion crispatum* Hauck foi coletado na Reserva Biológica do Arvoredo (27° 15' 47" S, 48° 20' 11" W), através de mergulho autônomo. *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne foi coletada na Ilha do Xavier (27° 36' 35" S, 48° 23' 9" O), também por meio de mergulho autônomo. Para serem transportados, os espécimes foram colocados individualmente em frascos plásticos de 500 ml dentro de uma caixa térmica, para evitar a desidratação das plantas e o aquecimento da água durante o transporte. No laboratório, os talos das algas foram selecionados, limpos com pincel, pinças e água do mar corrente para remover os epífitos presentes na superfície das mesmas. Imediatamente após a triagem, foram iniciados os experimentos. Não houve processo de aclimatação.

### 5.2. Desenho experimental

Se aplicaram três fatores com dois níveis cada um: temperatura pH e nutrientes com o fim de avaliar os efeitos nas algas *Lithothamnion crispatum* Hauck e *Sonderophycus capensis* (M) M.J. Wynne. Como condição controle, ou seja, simulando as condições atuais em ambientes preservados, foram utilizados os valores atuais de cada um dos fatores encontrados na baía da Ilha de Santa Catarina (Florianópolis), especificamente na costa da Lagoa da Conceição. Por outro lado, os valores de temperatura e pH das condições futuras e que simulam parte das mudanças climáticas foram estabelecidos a partir dos dados das previsões feitas para o ano 2100 na IPCC (2007).

Considerando que, a temperatura da baía da Ilha de Santa Catarina tem uma variação entre  $15^{\circ}\text{C} \pm 2$  (no inverno) e  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  (verão), foi definido o valor de  $18^{\circ}\text{C} \pm 0,2$  como condição controle. Enquanto às que condições futuras, no pior dos cenários se espera um aumento de  $6,4^{\circ}\text{C}$  segundo os valores prognosticados pela IPCC (2007). Portanto, a partir de um máximo de  $25\text{-}28^{\circ}\text{C}$  que pode chegar foi somado 5 graus de temperatura, utilizando-se  $30^{\circ}\text{C} \pm 0,2$  como valor de condições futuras.

Na costa sem mudanças climáticas, nos dias atuais, o pH varia entre 8,2 e 7,8, e atualmente na costa da Lagoa de Conceição, o pH encontrado é de 7,8. Assim, este valor foi selecionado como controle. Por outro lado, as predições feita por Feely et al. (2003) para o ano 2100, consideram que o pH poderia diminuir até 0,4 unidades. Desta forma, neste trabalho foi incluída a redução do pH para  $7,2 \pm 0,2$ .

Por último, no caso dos nutrientes, foram usados os níveis atuais de uma praia considerada pouco poluída como é Lagoa de Conceição, como controle. Para simular as condições futuras de nutrientes foram utilizados os dados de uma praia poluída da cidade (Tabela 1).

O experimento foi desenvolvido dentro de uma câmara com ambiente controlado no laboratório de Ficologia da UFSC. O ambiente desta câmara se encontrava sob temperatura constante ( $25^{\circ}\text{C}$ ), no qual estava instalada uma mesa de gradiente de temperatura. Nessa mesa, sobre sua superfície, existe uma resistência que permite aquecimento diferencial dessa superfície, a qual variava de 18 a  $32^{\circ}\text{C}$ .

Além desse sistema, foi montado um microcosmo, que consistiu em uma rede de água salgada que abastecia frascos de vidro de 1 L (marca Big Post). Estes frascos tinham 25 cm de altura por 10 cm de largura, com uma tampa hermética. Eles foram aleatorizados dentro de bandejas com água doce que estavam posicionadas na mesa de gradiente (a fim de homogeneizar as temperaturas de 18 e  $30^{\circ}\text{C}$ ), e rotacionados dentro da bandeja a cada duas horas (Figura 1). Assim, se utilizaram 24 frascos para os 8 tratamentos com 3 réplicas para cada tratamento. No total se utilizaram 4 bandejas (2 em cada temperatura) de 3 cm de altura, que continham 6 frascos cada uma (Figura 2).

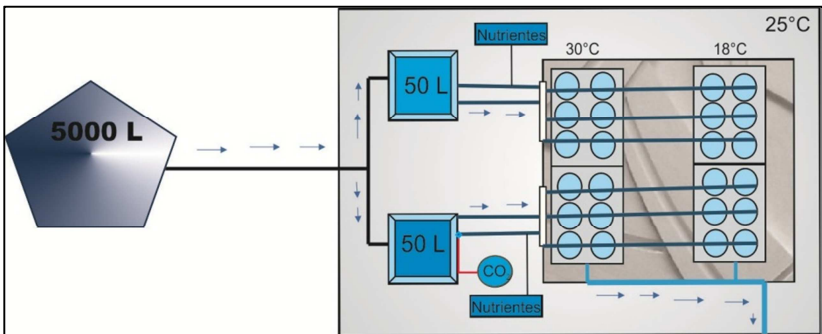
A rede de abastecimento de água do mar começava em um galão de 5000 L que abastecia com água salgada a dois galões menores de 50 L cada um (Figura 1), os quais se encontravam dentro da câmara de ambiente controlado. Cada galão (50 L) apresentava uma saída de 20 mm de diâmetro, conectando-se um sensor de pH na saída de água do galão que foi regulado para fornecer água com pH reduzido. O pH 7,2, foi obtido pela injeção de gás  $\text{CO}_2$  na água do mar (99,9% pureza), sendo manipulada a injeção pelo controlador de pH (Weipro pH Controller -pH-2010), o qual esteve conectado a uma solenoide, que por sua vez, se conectava ao cilindro de  $\text{CO}_2$ . O controlador de pH injetava



gás  $\text{CO}_2$  na água do mar, quando o pH (detectado pelo sensor) se encontrava acima de 7,2. Assim, as saídas de água se dividiam em outras duas saídas que se conectavam a torneiras que derivavam em 12 mangueiras de silicone (por galão de 50 L) de 2 mm de diâmetro (Figura 1).

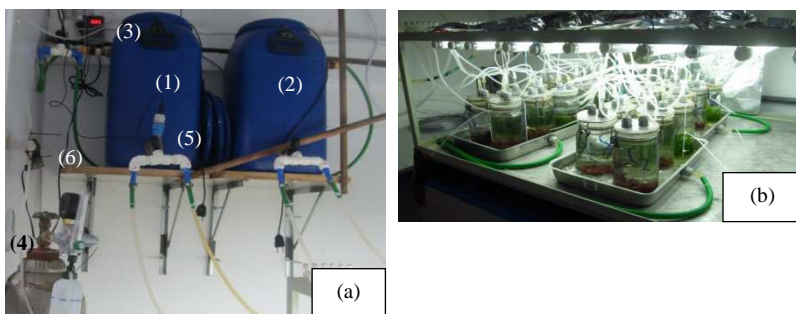
Para simular a movimentação do fundo do oceano e conseguir uma mistura de água dentro dos frascos, o tampo da mesa proveu de um movimento ondulatório. Assim foi simulada uma condição de ondulação de baixa a moderada com um período de oscilação de 40 deslocamentos por minuto, percorrendo uma amplitude de 10 cm. Finalmente, para a manipulação dos nutrientes em uma das duas saídas de cada galão foi adicionado nutrientes considerando uma vazão tal para se atingir a concentração constante requerida (Tabela 1). O sistema foi aberto, que implica no descarte da água que saía do sistema.

O experimento foi mantido por três dias, com lâmpadas que ficavam acima dos frascos e que proviam uma irradiância média de  $50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo 12:12 (luz:escuro)



**Figura 1:** Desenho esquemático do experimento com sistema de circulação de água aberto feito numa câmara de ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) constante em cor cinza. As linhas pretas e azuis representam a rede de água que começava desde o tanque de 5000 L que derivava a dois galões de 50 L que alimentavam de água os frascos de 1 L. Os frascos (unidades experimentais) de cor azul se encontravam situados sobre uma mesa de gradiente de temperatura representado em cor cinza com linhas na figura. As setas azuis indicam o sentido da circulação da água. Os nutrientes estão representados por retângulos de cor celeste e que eram injetados a uma das mangueiras em cor azul. Finalmente para reduzir o

pH, foi injetado  $\text{CO}_2$ , representando o cilindro de  $\text{CO}_2$  com um círculo celeste, a um galão de 50 L.



**Figura 2:** Acessórios utilizados no preparo do experimento feito no laboratório. **(a)** Galões de 50L com injeção de  $\text{CO}_2$  (1) e sem injeção (2) conectado ao controlador de pH (Weipro pH Controller –pH-2010) no extremo superior esquerdo (3). O eletrodo do controlador de pH (5) foi inserido no cano de saída da água do mar do galão com injeção de  $\text{CO}_2$  (1). Na parte inferior esquerda, o cilindro de  $\text{CO}_2$  conectado com o solenoide (6) controladora da saída de  $\text{CO}_2$  (4). **(b)** Disposição das unidades experimentais (frascos) na mesa de gradiente de temperatura.

**Tabela 1:** Valores das concentrações de nutrientes de um ambiente controle (atual) e hipertrófico (futuro) que se utilizaram durante os experimentos. Foram utilizadas as mesmas fontes de nutrientes que as mencionadas por Martinez & Rico (2004).

Nutrientes	Fonte de nutrientes	Concentração	Concentração
		controle (atual)	hipertrófica (futuro)
Fosfato	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	1,5 $\mu\text{M}$	3 $\mu\text{M}$
Nitrato	$\text{NaNO}_3$	2,5 $\mu\text{M}$	30 $\mu\text{M}$
Amônia	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,5 $\mu\text{M}$	60 $\mu\text{M}$

### 5.3. Análise de nutrientes

As amostras para a análise da água foram coletadas com uma seringa, colocadas em frascos plásticos e congelados para sua posterior análise. As análises de água foram baseadas no método colorimétrico. As análises de nitrato e fosfato foram feitas de acordo com o método de Grasshoff et al. (1983). O N-amoniacoal foi determinado pelo método de Tregue & Le Corre (1976) e Grasshoff et al. (1983). Todas as amostras, tanto de nitrato, fosfato e N-amoniacoal foram lidas no espectrofotômetro (Biospectro P-220) em cubeta de 5 cm a 540 nm, 630 nm e 880 nm respectivamente. Para fazer a análise de nutrientes foram tomadas duas amostras de água por tratamento em frascos de plásticos, previamente lavados com ácido 10%.

### 5.4. Alcalinidade

A alcalinidade é o número de prótons e  $\text{H}^+$  necessários para neutralizar as bases duma amostra de água. Esta medida entra no cálculo do  $\text{CO}_2$  total dissolvido nas amostras de água, o qual é utilizado para determinar o metabolismo do carbono. Além disso, a alcalinidade é modificada por qualquer processo que envolva a produção ou eliminação de íons  $\text{H}^+$ ,  $\text{OH}^-$  e bases e ácidos fracos (Henry 1995).

A medida de alcalinidade total é uma acidimetria, cujo final da titulação é obtido quando o pH da solução se torna igual ao pH da

neutralização das bases presentes na água, ou seja, quando todo o bicarbonato é convertido em  $\text{CO}_2$ .

O método utilizado para medir a alcalinidade neste trabalho foi o método de Gran. Este método baseia-se na titulação do ácido clorídrico (HCl) na amostra de água até ultrapassar o ponto de neutralização e chegar a um aumento da concentração de prótons de  $\text{H}^+$  por excesso de ácido. Ao final do experimento coletou-se 10 ml de água por frasco de cada tratamento. As amostras foram colocadas em tubos plásticos e foram fixadas com 1 ml de HCl 0,0025 N para posterior análise. No momento da análise, se adicionou 25 ml de água destilada a cada amostra, realizando-se titulações sucessivas com 0,1 ml de HCl 0,0025 N, medindo-se a cada titulação o pH. Com os resultados das medidas do pH das sucessivas titulações, foi calculada a alcalinidade de cada amostra. Além disso, os dados de alcalinidade foram usados para calcular as diferentes formas de carbono como  $\text{HCO}_3^{-2}$ ,  $\text{CO}_3^{-2}$  e as saturações de calcita e aragonita na água do mar de cada tratamento. Isto foi feito através do programa CO2Sys\_v2.1.xls usando K1, K2 de Milero (2010).

#### 5.5. *Medições da Fotossíntese por meio da fluorescência in vivo da clorofila a*

O fotossistema é um complexo proteico que ocorre na membrana plasmática dos tilacoides no caso de plantas terrestres e algas. Existem dois tipos fotossistema: I e II. O fotossistema II (PSII) tem a capacidade de absorver luz sendo usada para atividades fotoquímicas. Alternativamente, a energia da radiação, além de ser absorvida pelo fotossistema II, pode ser perdida através de calor ou fluorescência (Baker 2008). Portanto, as medições deste parâmetro vão estar baseadas na emissão de fluorescência do fotossistema II a partir do qual se pode estimar o funcionamento do aparato fotossintetizante.

Para medir a fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) do fotossistema II, foi utilizado um fluorômetro de pulso de amplitude modulada (Diving PAM underwater fluorometer; Walz, Effeltrich, Germany). Para se obter os parâmetros que foram utilizados ao longo do experimento, foram realizadas análises preliminares das condições ótimas de medida para configurar os parâmetros de luz utilizados durante todo o experimento com o PAM. A fluorimetria medida com o equipamento PAM está baseada principalmente em pulsos de luz azul, emitidas para a porção de alga, dando como respostas fluorescência de luz vermelha como estresse.

Foram medidos diversos dados com PAM que permitiram os cálculos dos parâmetros necessários para observar o rendimento do aparato fotossintético:

$F_m'$ : fluorescência máxima emitida quando o organismo se encontra pre-aclimatado a condições de luz.

$F_o'$ : fluorescência basal emitida pelo organismo que se encontra pre-aclimatados a condições de luz.

O rendimento quântico efetivo ( $\Delta F_v/F_m'$ ) foi medido duas vezes por dia, de manhã (10:00 h) e de tarde (17:00 h), durante três dias e foi obtido através de pulsos de luz curtos e da aclimação do organismo sob condições de iluminação. Se obtiveram um total de 6 medições em todo o experimento. Deste modo, se obtiveram as seguintes medições contando desde o tempo após do início do experimento: 0, 5 h, 24 h, 29 h, 48h e 53 h. Desta forma, para o cálculo do rendimento quântico efetivo se utilizou a seguinte fórmula:

$$\Delta F_v/F_m': (F_m' - F_o')/F_m'$$

Posteriormente com os valores de  $\Delta F_v/F_m'$ , foram calculados os valores da taxa de transporte de elétrons (ETR), através da fórmula:

$$ETR = \Delta F/F_m' \times I \times A \times F_{II}$$

I: radiação que atinge as algas e que era dada pela mesa de gradiente de temperatura.

A: absortância, que é a quantidade de irradiância absorvida pela alga.

$F_{II}$ : para algas vermelhas o valor é 0,15 e é a fração de clorofila associado ao fotossistema II.

## 5.6. Calcificação

Inicialmente, as algas foram secas em estufa a 60°C até ter um peso constante e posteriormente foram pesadas em uma balança analítica (ABS-Fat) e colocadas em tubos com 7 ml de ácido clorídrico anidro (HCl) a 10% por 24 horas, com o fim de induzir a descalcificação das algas. Completada a descalcificação, o excesso de HCl foi removido e as algas foram novamente secadas na estufa a 60°C e novamente pesadas. O cálculo da calcificação das algas calcárias foi feito através da diferença entre o peso das algas calcificadas e descalcificadas.

### 5.7. Análises Estatísticas

O teste de homocedasticidade de variâncias (Cochran) foi utilizado *a priori* para se verificar a homogeneidade dos dados. Sendo os dados homocedásticos se procederam as análises estatísticas com o programa *Statistica* (versão 7). Fez-se ANOVA fatorial aninhada com a variável ETR, enquanto que os outros descritores relativos à química da água e calcificação foram testados utilizando-se ANOVA fatorial. Para todas as análises estatísticas se escolheu um nível de significância  $\alpha$  de 1%. Posteriormente para se avaliar as diferenças entre tratamentos foi utilizado o teste de Student-Neuwman-Keuls –SNK.

## 6. Resultados

O experimento teve uma duração de três dias, e foi observada mortalidade das algas durante o período. A mortalidade se definiu pela descoloração, tanto de *Lithothamniom crispatum* como de *Sonderophycus capensis*, e que passou de um vermelho escuro (nas duas algas) até um rosa pálido. Este fenômeno foi observado nos tratamentos que se encontravam em temperatura elevada (30°C), afetando especialmente a *Lithothamniom crispatum*, que apresentou uma membrana transparente e gelatinosa ao seu redor.

Quanto à concentração de nutrientes, nos tratamentos que se encontravam sem adição de nutrientes, estes valores foram as seguintes: fosfato foi de  $1,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$ , nitrato  $3,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$  e amônia  $1,94 \pm 0,188 \mu\text{M}$ . Nos tratamentos que se adicionaram nutrientes, os valores foram os seguintes: fosfato  $5,3 \pm 1,2 \mu\text{M}$ , nitrato  $25,5 \pm 0,86 \mu\text{M}$  e amônia  $53,1 \pm 2,4 \mu\text{M}$ .

### 6.1. Alcalinidade

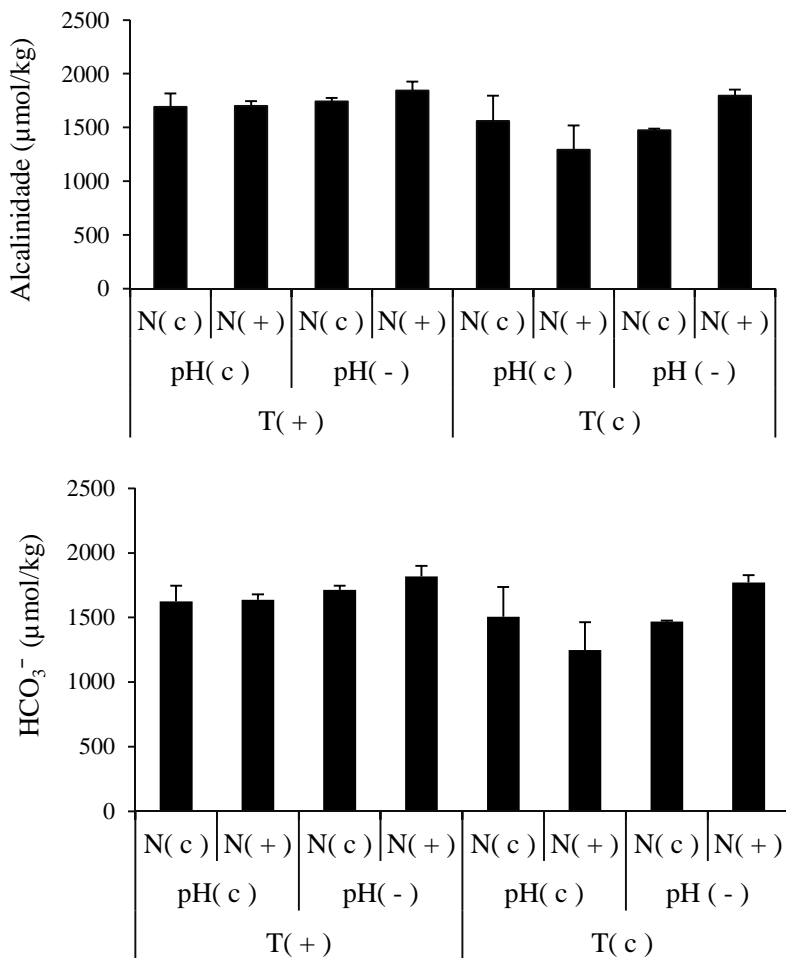
O borbulhamento de  $\text{CO}_2$  resultou em alterações significativas da química do carbono da água do mar das unidades experimentais. Desta forma o pH apresentou, por sua vez, significativa interação com a temperatura. As concentrações de carbonato ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) foram menores (Tabela 2) nos tratamentos que se encontravam em pH reduzido (Figura 4), sendo significativamente diferentes ( $F_{1,8}= 171,6$ ,  $p<0,01$ ) dos tratamentos que estavam em pH controle. Além disso, os resultados estatísticos também revelaram o efeito aditivo da temperatura ( $F_{1,8}=27,25$ ,  $p<0,01$ ), obtendo-se as maiores concentrações de  $\text{CO}_3^{2-}$  em frascos submetidos à temperatura mais alta (Tabela 2; Figura 4).

As saturações de calcita e aragonita foram significativamente menores (Tabela 2; Figura 4) em tratamentos sob pH menor (Calcita,  $F_{1,8}=173,3$ ,  $p<0,01$ ; Aragonita  $F_{1,8}=178,6$ ,  $p<0,01$ ) em comparação aos tratamentos que se encontravam em pH controle. Adicionalmente, as saturações de calcita e aragonita também foram maiores em alta temperatura (Tabela 2, Figura 4) sendo significativamente diferentes (Calcita  $F_{1,8}= 29,8$   $p<0,01$ ; Aragonita  $F_{1,8}= 37,4$   $p<0,01$ ) com os tratamentos em temperatura controle. Considerando os teores de alcalinidade e bicarbonato, não foram observadas variações significativas entre os tratamentos ( $\text{HCO}_3^-$ ) (Tabela 2, Figura 3).

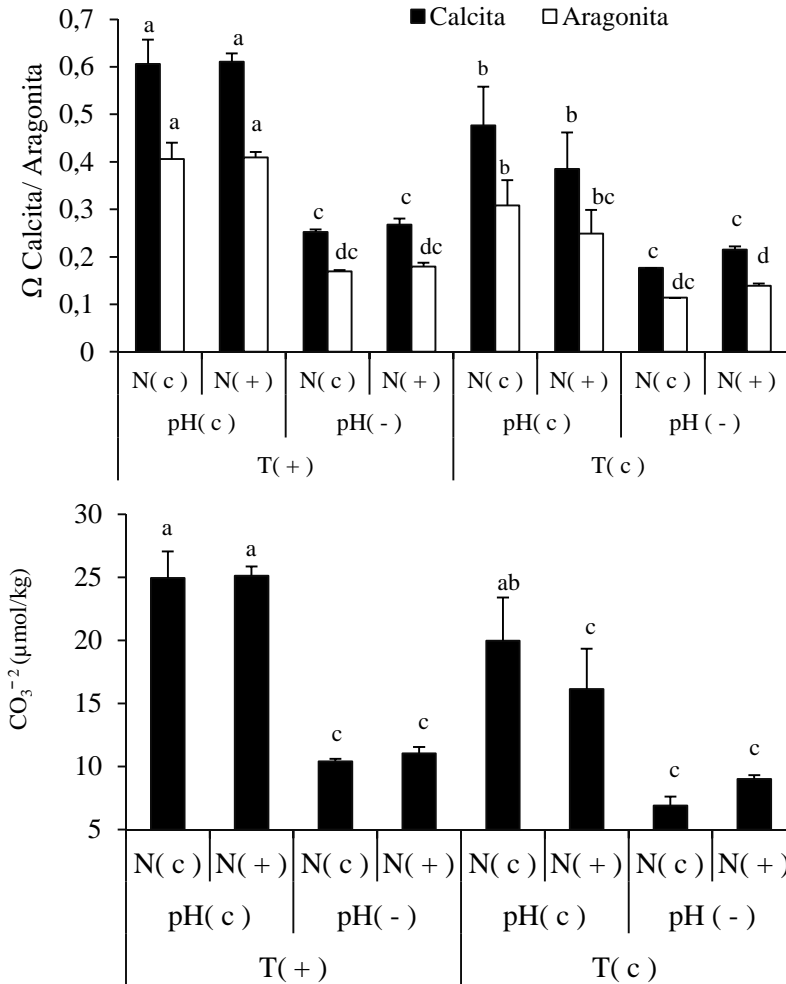


**Tabela 2:** Concentrações das espécies de carbono, ademais de tipos de carbonatos de cálcio como calcita (ca) e aragonita (ar), analisadas de amostras de água do mar extraídas no final do experimento e que encontravam sob os tratamentos. Os níveis de cada fator, se encontram sinalados na tabela.

		Alcalinidade	$\text{HCO}_3^-$	$\text{CO}_3^{2-}$	$\Omega_{ca}$	$\Omega_{ar}$
Temperatura controlada (18°C)	pH 7,8	1560,7±236,03	1506,9±228,9	20±3,4	0,48±0,08	0,31±0,05
	Nutrientes elevados (N90µM, P3µM)	1293,3±224,08	1247,5±217,3	16,1±3,2	0,38±0,07	0,25±0,008
	pH 7,2	1474,3±14,14	1464,3±14,14	7,4±0,7	0,18	0,11
	Nutrientes elevado (N90µM, P3µM)	1795,3±57,52	1731,1±56,9	9±0,29	0,21±0,007	0,14±0,005
Temperatura elevada (30°C)	pH 7,8	1689,9±126,36	1625,1±122,04	24,9±2,09	0,61±0,05	0,41±0,034
	Nutrientes elevado (N90µM, P3µM)	1701,3±44,25	1636,1±42,74	25,1±0,73	0,61±0,01	0,41±0,01
	pH 7,2	1740,9±53,31	1714,4±32,90	10,4±0,20	0,25±0,005	0,17±0,003
	Nutrientes elevado (N90µM, P3µM)	1844,8±83,10	1816,9±82,07	11,02±0,5	0,27±0,01	0,18±0,008



**Figura 3:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle sob a alcalinidade (a) e do íon  $\text{HCO}_3^-$  (b) na água do mar coletada de cada um dos tratamentos. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão. Não se encontraram diferenças significativas entre os tratamentos.

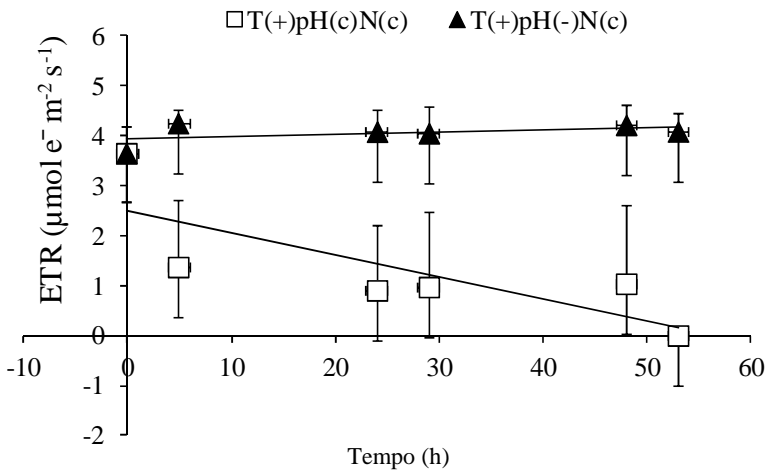
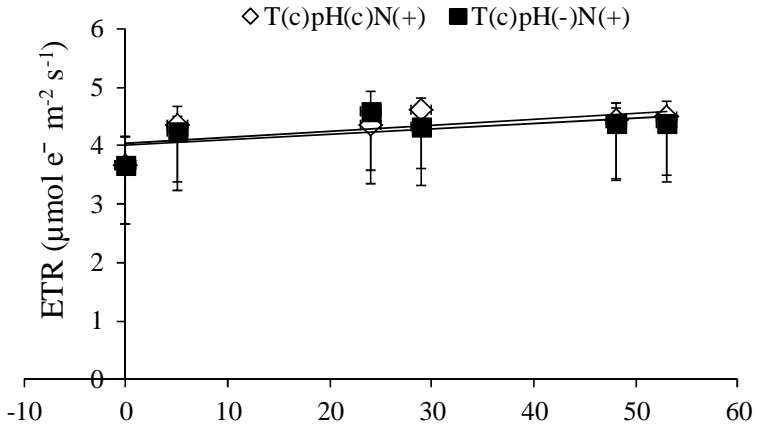


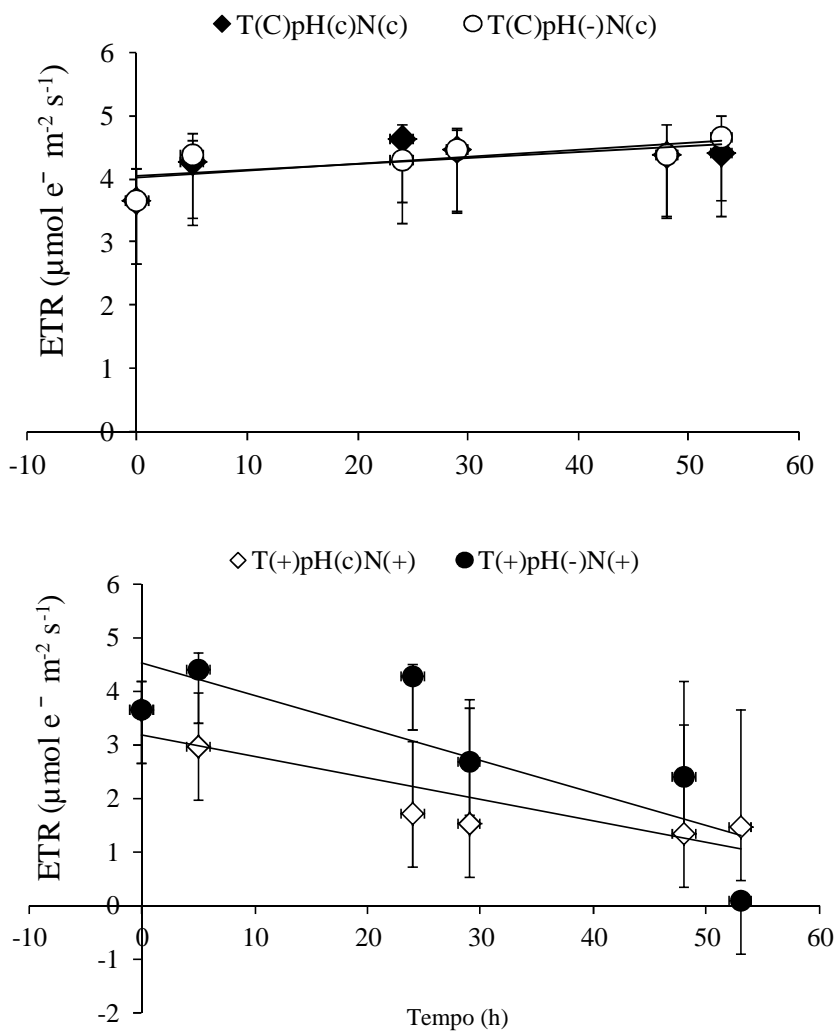
**Figura 4:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle sob saturação de calcita e aragonita (a) e do íon  $\text{CO}_3^{2-}$  (b) na água do mar coletada de cada um dos tratamentos. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão. As letras sobre as barras representam as significativas entre os tratamentos, segundo o teste a posteriori (SNK).

## 6.2. Fluorescência

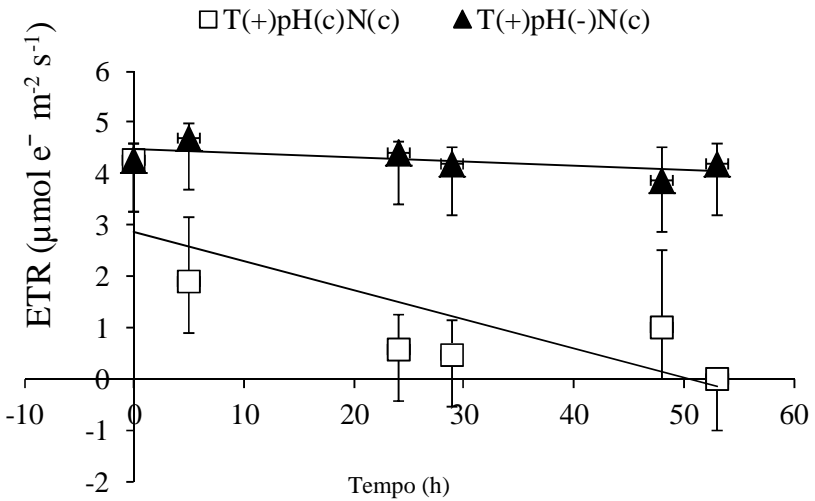
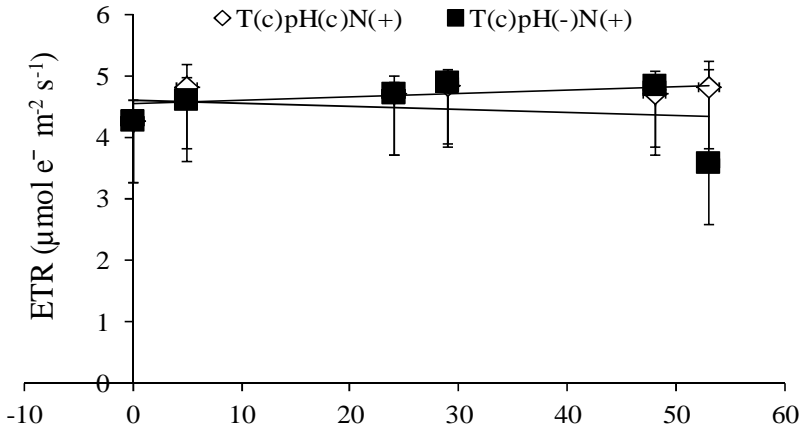
### 6.2.1. Taxa de transporte de elétrons (ETR)

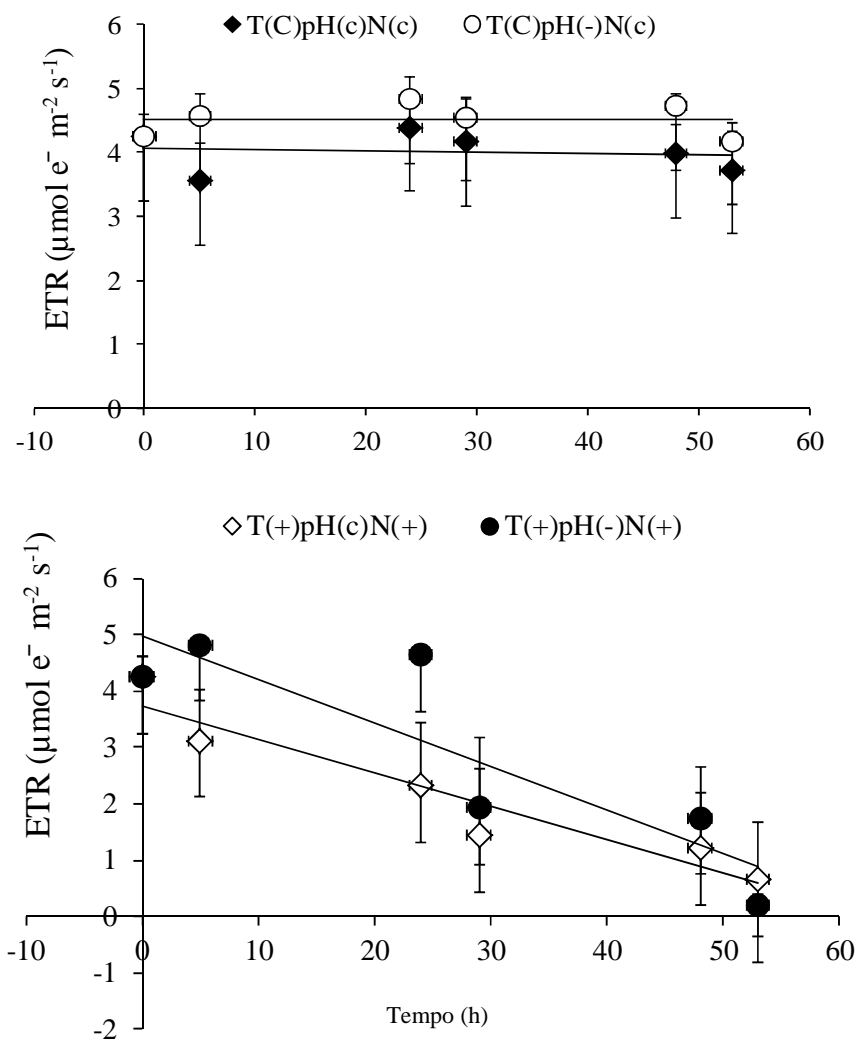
Ao longo do período do experimento e logo nas primeiras avaliações após 5 h (Figura 5 e 6), o aquecimento da água (tabela 4) promoveu reduções da ETRs de *L. crispatum* ( $F_{1,16}=24,7$ ,  $p<0,01$ ) e de *S. capensis* ( $F_{1,16}= 7,95$ ,  $p= 0,0123$ ) especialmente quando combinada com o enriquecimento da água com nutrientes ou ainda com o pH controle ou não acidificado (Tabela 4). Por outro lado, a adição de CO<sub>2</sub>/baixo pH em condições de água não enriquecida ou controle, tanto em *L. crispatum* ( $F_{1,16}= 24,7$ ,  $p<0,01$ ) como em *S. capensis* ( $F_{1,16}= 24,58$ ,  $p<0,01$ ), promoveu a manutenção das ETRs com valores significativamente superiores aos respectivos controles nas condições de temperatura elevada (Tabela 4). Por sua vez, a manutenção da temperatura a 18°C manteve as ETRs relativamente constantes ao longo de todo o experimento, independente da combinação dos demais fatores, para ambas as espécies (Figura 5 e 6).





**Figura 5:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle (c) sobre a ETR de *Lithothamnion crispatum*. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão dos dados.





**Figura 6:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle (c) sobre a ETR de *Sonderophycus capensis*. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão.

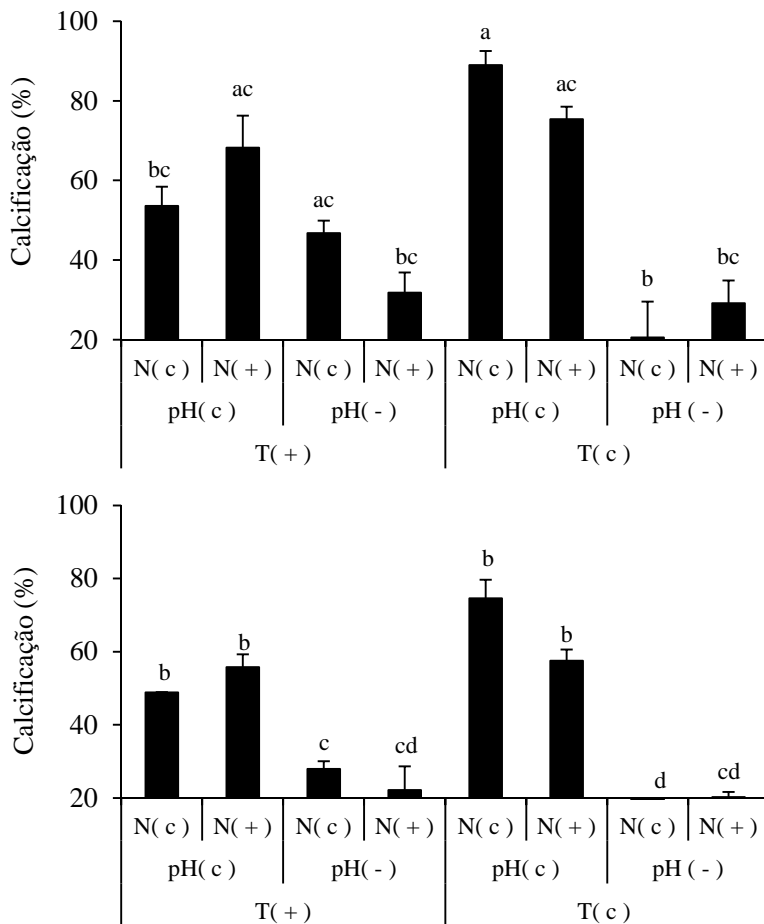


**Tabela 3:** ANOVA fatorial dos efeitos da temperatura, carbono e nutrientes depois do período de tempo 5 h da ETR ( $\mu\text{mol e}^- \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) em *Lithothamnion crispatum* e *Sonderophycus capensis*.\* para conseguir homogeneidade de variâncias foi substituído 1 outlier pela média do grupo ( $df = 47$ ).

	<i>df</i>	MS	<i>F</i>	<i>p</i>
Temperatura (T) <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	1	22,710	24,706	<0,01
	1	10,08	7,95	0,0123
Carbono (C) <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	1	22,710	24,706	<0,01
	1	31,18	24,58	<0,01
Nutrientes (N) <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	1	3,972	4,321	0,054092
	1	7,76	6,12	0,024926
C x T <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	1	22,888	24,900	<0,01
	1	15,4	12,4	<0,01
C x N <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	1	4,092	4,452	0,050967
	1	6,15	4,85	0,042590
T x N <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	1	4,353	4,736	0,044869
	1	0,002	0,0017	0,967529
C x T x N <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	1	2,204	2,398	0,141045
	1	0,025	0,0198	0,88995
Frasco(CxTxN) <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	16	0,919	9,134	0,011452
	16	1,268	12,64	0,0000
Residual <i>L. crispatum</i> <i>S. capensis</i>	48*	0,101		
	48	0,100		

### 6.3. Calcificação

A acidificação do meio reduziu a calcificação, tanto em *Lithothamnion crispatum* ( $F_{1,16}=12,73$ ,  $p<0,01$ ) como em *Sonderophycus capensis* ( $F_{1,16}=172,18$ ,  $p<0,01$ ) (Tabela 4, Figura 7). Estes valores foram significativamente mais baixos para ambas as espécies quando nutrientes foram adicionados (*L. crispatum*  $F_{1,16}=13,42$ ,  $p<0,01$ ; *S. capensis*  $F_{1,16}=18,83$ ,  $p<0,01$ ). Em *S. capensis*, estes valores foram ainda menores ( $F_{1,16}=12,93$ ,  $p<0,01$ ) quando a temperatura foi mantida nos níveis atuais e não se adicionou nutrientes na água (Figura 7).



**Figura 7:** Efeito da interação da Temperatura elevada (+) e controle (c), pH baixo (-) e controle (c) e nutrientes elevados (+) e controle (c) sobre *Lithothamnion crispatum* (a) e *Sonderophycus capensis* (b). Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão. As letras sobre as barras representam as diferenças significativas entre os tratamentos, segundo o teste a posteriori (SNK).

**Tabela 4:** ANOVAs dos efeitos da temperatura, carbono e nutrientes e sua combinação sobre a calcificação na espécie de rodólito *Lithothamnion crispatum* e *Sonderophycus capensis*.

		<i>df</i>	MS	<i>F</i>	<i>p</i>
Temperatura (T)	<i>L. crispatum</i>	1	14,56	0,0483	0,828874
	<i>S. capensis</i>	1	0,000	0,000	0,994727
Carbono (C)	<i>L. crispatum</i>	1	340,53	12,73	<0,01
	<i>S. capensis</i>	1	8060,52	172,18	<0,01
Nutrientes (N)	<i>L. crispatum</i>	1	5,96	0,0197	0,89004
	<i>S. capensis</i>	1	182,08	3,889	0,066132
C x T	<i>L. crispatum</i>	1	4049,65	13,42	<0,01
	<i>S. capensis</i>	1	881,70	18,83	<0,01
C x N	<i>L. crispatum</i>	1	0,000	0,0000	1,0000
	<i>S. capensis</i>	1	132,40	2,97	0,103671
T x N	<i>L. crispatum</i>	1	32,40	0,1074	0,747343
	<i>S. capensis</i>	1	1,07	0,022	0,881950
C x T x N	<i>L. crispatum</i>	1	2871,53	9,52	<0,01
	<i>S. capensis</i>	1	605,56	12,93	<0,01
Residual	<i>L. crispatum</i>	16	301,63		
	<i>S. capensis</i>	16	48,83		

## 7. Discussão

Os ecossistemas costeiros se encontram entre os sistemas naturais mais valiosos e utilizados pela espécie humana em todo o planeta. Eles provem múltiplos serviços, incluindo a proteção do litoral, refugio e alimento para milhares de espécies. Entre os tantos impactos humanos que ameaçam o funcionamento dos ecossistemas costeiros, as mudanças climática podem atuar na mais variadas escalas espaciais e temporais (Benhardt et al. 2013). Neste estudo observou-se uma grande sensibilidade das algas calcárias avaliadas ao aquecimento da água que compromete principalmente a ETR das duas espécies em questão. Assim, nos tratamentos que se encontravam em temperatura elevada, observou-se a mortalidade de *Lithothamnion crispatum* e de *Sonderophycus capensis* ao final do terceiro dia de experimento. Este fato foi observado através do branqueamento do tecido das duas espécies nos tratamentos que se encontravam em alta temperatura. Desta forma, a resposta das duas algas foram similares.

Com base nos resultados deste trabalho, a hipótese fundamentada no maior rango de distribuição de *L. crispatum*, especialmente em águas quente, fazia esta espécie mais resistente a maiores temperaturas que a *S. capensis* que é uma espécie de água frias. deve ser negada. Já que *L. crispatum* não apresentou maior resistência aos aumentos da temperatura em comparação a *S. capensis*. Estes resultados se assemelham com os obtidos por Martin & Gattuso (2009) ao expor a alga crostosa *Lithophyllum cabiochae* a ambientes aquecidos, obtendo rápidas mortalidades. Por outro lado, neste trabalho a acidificação do meio beneficiou a fotossíntese assim como também a sobrevivência de ambas as espécies em um dos quatro tratamentos que se encontravam em ambiente aquecido (Figura 5 e 6). Pelo contrário, em experimentos com *Porolithon onkodes*, Diaz- Pulido et al. (2012) observaram um efeito negativo da acidificação da água por adição de CO<sub>2</sub>, uma vez que estes descreveram taxas elevadas de mortalidade relacionadas às altas concentrações de CO<sub>2</sub>.

Como já foi comentado acima, os resultados deste trabalho demonstraram que as duas espécies em estudo, *L. crispatum* e *S. capensis*, responderam principalmente à temperatura. Deste modo, se observou um efeito aditivo da temperatura elevada, diminuindo a ETR em média 73% (nas duas espécies) na maioria dos tratamentos que se encontravam em temperatura elevada no período de tempo que realizado

o experimento (Tabela 4, Figura 5,6). Esta mesma resposta foi observada em espécies de *Halimeda*, diminuindo o rendimento quântico efetivo em temperaturas elevadas (Sinutok et al. 2012). Steller et al. (2007) observaram que o potencial fotossintético de *Lithophyllum margaritae* esteve fortemente regulado pelas flutuações da temperatura. A referida espécie é igualmente descrita para a Ilha de Arvoredo, e segundo os autores, as condições ótimas de temperatura para esta alga são ao redor de 25°C, sendo que temperaturas superiores a esta os espécimes em análise diminuíam a taxa fotossintética. Segundo Steller et al. (2007), estas respostas seriam consequência de regulação negativa de processos metabólicos que são regulados por enzimas, que por sua vez são altamente sensíveis à altas temperaturas (30°C).

Além disso, o pH também atuou de forma aditiva no presente experimento evitando a mortalidade e mantendo o rendimento fotossintético no tratamento que se encontrava em pH 7,2. Nas macroalgas, as respostas podem ser variadas, com respeito ao aumento da concentração de CO<sub>2</sub> ou pH reduzido na água do mar. Em algas pardas calcificadas como *Padina* spp., o incremento da concentração de carbono favorece a taxa de transporte de elétrons (Johnson et al. 2012). Em algas Corallinales, diferentes respostas tem sido descritas. Russell et al. (2009) descrevem uma redução da fotossíntese com o aumento das concentrações de CO<sub>2</sub>. Por outro lado, Burdett et al. (2012) sugere que as Corallinales tem a capacidade de usar diretamente o CO<sub>2</sub>, sendo que sua adição na água beneficia a fotossíntese dos representantes do grupo. Neste trabalho, em um dos tratamentos se observou um efeito positivo do decrescimento do pH. Isto porque, de forma geral, os tratamentos que se encontravam em alta temperatura tiveram uma forte queda do ETR ao término do experimento (Figura 4), com exceção do tratamento sob temperatura elevada, pH reduzido (7,2) e nutriente controle. Assim, o pH menor favoreceu a ETR, tendo um efeito antagônico com a temperatura. Por outro lado, em experimentos feitos com duas espécies de *Halimeda* (*H. macroloba* e *H. cylindracea*), observou-se um efeito negativo da sinergia de temperatura e CO<sub>2</sub>.

Existem uma serie de trabalhos que já verificaram que a acidificação afeta negativamente a calcificação de diferentes grupos de organismos como o trabalho feito por Noisette et al. (2013), que observaram a diminuição da calcificação no rodolito *Lithothamnion corallioides* nos tratamentos que se encontravam em alta concentração de CO<sub>2</sub>/baixo pH (desde 380 para 1000 ppm). Desta forma, nosso

trabalho também observou que a acidificação atuava negativamente e de forma aditiva em *Lithothamnion crispatum* *Sonderophycus capensis* obtendo-se um decrescimento similar da calcificação, quando as duas espécies se encontravam em um pH mais baixo (7,2). Este fato, também é corroborado por Martin & Gattuso (2009) em Corallinales, com *Lithophyllum cabiochae*, o CO<sub>2</sub> e baixo pH atuaram independentemente, diminuindo sua calcificação (). Este fenômeno também foi observado no rodolito *Hydrolithon* spp (Semesei et al. 2009). É importante ressaltar que existem duas formas de CaCO<sub>3</sub> chamadas calcita e aragonita, as que tem diferente solubilidade segundo as proporções de Ca e Mg destas moléculas. Assim, as espécies dessa ordem como *Lithothamnion crispatum* que tem uma composição de calcita (contendo Mg em sua estrutura) poderiam apresentar maior solubilidade do carbonato em comparação com *Sonderophycus capensis*, quem tem aragonita em sua composição. Entretanto, a hipótese proposta neste trabalho sobre a maior resistência de *Sonderophycus capensis* a pHs menores que *Lithothamnion crispatum* foi rejeitada, já que não se observaram diferenças significativas na calcificação quando as algas foram submetidas a pH baixos. Por outro lado, o aquecimento da água beneficiou levemente a calcificação quando se encontrava em pH baixo. Mais estudos são necessários para confirmar esta tendência.

Este trabalho mostrou um efeito positivo da temperatura elevada quando as algas se encontravam em ambiente acidificado (Figura 7). Este fato concorda com experimentos em *Porolithon onkodes*, a qual apresentou efeito negativo da acidificação da água por adição de CO<sub>2</sub>, mas também um efeito interativo com temperatura, sendo levemente maior a calcificação quando a temperatura foi incrementada (Diaz- Pulido et al. 2012). Contraditoriamente, autores como Martin & Gattuso (2009), assinalaram uma forte interação entre o CO<sub>2</sub> e a temperatura podendo decrescer em até 50% a calcificação de *L. cabiochae* em presença destes dois fatores elevados. Diaz-Pulido et al. (2012) também observaram interação entre temperatura e CO<sub>2</sub> mas com o efeito negativo do aumento da temperatura, sendo maiores as taxas de descalcificação neste ambiente. Não obstante, Noisette et al. (2013), não observaram a interação entre o CO<sub>2</sub> e temperatura sobre a calcificação de *L. corallioides*.

A acidificação da água do mar tem como consequências as mudanças das espécies químicas dissolvidas como o incremento do CO<sub>2</sub> dissolvido, bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e por outro lado a redução do

carbonato ( $\text{CO}_3^{-2}$ ) (Honisch et al. 2012; Jury et al. 2010), conforme observado neste trabalho experimental em microcosmo. Estas mudanças nas espécies químicas são principalmente observadas pela alcalinidade. A alcalinidade representa a capacidade de um meio aquoso para neutralizar ácidos, e, deste modo, a precipitação ou dissolução de  $\text{CaCO}_3$  contribui com a variabilidade da alcalinidade (Millero et al. 1998; Steller et al. 2007). Autores como Feely et al. (2004) assinalam que o aumento da alcalinidade facilitaria a solubilidade do  $\text{CO}_2$  atmosférico na água do mar. Entretanto, neste trabalho não se observaram mudanças na alcalinidade e quantidade de  $\text{HCO}_3^-$  observada na água dos distintos tratamentos (Tabela 3, Figura 3). Desta forma, pode-se inferir que a ausência de diferenças significativas nestas variáveis, podem estar relacionadas ao curto intervalo de tempo (6 hs) de permanência do  $\text{CO}_2$  e, portanto, da água acidificada nos respectivos reservatórios (galões de 50 L). Além disso, o tempo de residência da água do mar nas unidades experimentais também foi curto, sendo só de 15 minutos. Estes resultados são corroborados por Martin e Gattuso (2009) que igualmente não observaram mudanças na alcalinidade quando injetaram gás  $\text{CO}_2$  na água do mar por curtos períodos de tempo de retenção. Estes autores afirmam ainda que a aplicação de  $\text{CO}_2$  deve ser feita por longos períodos de tempo (>1 mês) para se observar mudanças neste aspecto da química da água. Por outro lado, nas variáveis restantes ( $\text{CO}_3^{-2}$ , calcita e aragonita), os fatores temperatura e carbono atuaram de forma aditiva ( $p < 0,01$ ) não observando-se nenhuma sinergia dos fatores. O íon  $\text{CO}_3^{-2}$  teve mudanças mais visíveis nos tratamentos que se encontravam em baixo pH (-0,4), sendo 43% menores as concentrações de  $\text{CO}_3^{-2}$  (Figura 3), com respeito aos tratamentos que se encontravam em pH controle (7,8). Isto concorda com o observado por Semesi et al. (2009), em experimentos feitos com a alga calcárea *Hydrolithon* sp., que apresentou diminuição dos íons  $\text{CO}_3^{-2}$  em condições de acidificação. Outro fator que teve grande influência sobre as concentrações de  $\text{CO}_3^{-2}$  foi a temperatura. Nos tratamentos que se encontravam em alta temperatura as concentrações deste íon foram maiores (Figura 4).

Por outro lado, o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), proveniente dos organismos e do sedimento, tem um importante papel na biogeoquímica marinha atuando como buffer (tampão) quando variam as concentrações de  $\text{CO}_2$  (Basso 2012; Feely 2004; Doney et al. 2009). Esta taxa de dissolução das espécies de carbonatos também pode ser alterada por outros fatores como variações na salinidade, temperatura, pressão etc.



No presente trabalho, se analisaram o conteúdo, tanto de calcita como de aragonita na água de cada replica de cada tratamento, observando-se reduções de suas saturações nos ambientes acidificados (Figura 4). Avaliando-se o desempenho de *Corallina officinalis* em ambientes acidificados (pH 7,6), Hofmann et al. (2012) observaram semelhante redução na saturação de calcita. Este fato também é corroborado por Russell et al. (2009) na Corallinales *Lithophyllum* spp. que em pH de 7,95 apresenta semelhante redução na concentração de calcita. Assim como a calcita, a aragonita foi menor ( $0,15\pm 0,01$ ) nos tratamentos que se encontravam em ambiente acidificado, tendo saturação 43,8% menor que nos respectivos tratamentos controle. Diminuição semelhante da saturação de aragonita na água foi observado em avaliação da acidificação na fisiologia de *Padina* sp. (Johnson et al, 2012). Em nosso experimento, esperava-se uma maior redução relativa da aragonita em relação à calcita com o processo de acidificação, uma vez que a aragonita chega a ser 50% mais solúvel do que a calcita em ambientes acidificados (Doney et al. 2009; Feely et al. 2004; Smith et al. 2012). Entretanto, maior participação relativa de carbonatos de Mg pode conferir à aragonita menor solubilidade, passando seu comportamento a ser semelhante em relação à calcita no presente experimento (Basso 2012). Segundo Smith et al. (2012), as concentrações do conteúdo de Mg variam naturalmente entre espécies de algas calcárias o que explicaria a variabilidade observada. A saturação de calcita variou de maneira significativa com a temperatura, sendo 16% maior nas unidades aquecidas (Figura 4). Da mesma forma, as saturações de aragonita foram levemente maiores (17%) nos tratamentos com temperatura elevada ( $0,29\pm 0,010$ ) em comparação aos tratamentos em temperatura controle ( $0,20\pm 0,010$ ). Apesar de outros parâmetros ambientais, como nutrientes dissolvidos, influenciarem na saturação de  $\text{CaCO}_3$  (Doney et al. 2009), não se observou nenhum efeito destes sobre as saturações de calcita e aragonita.

As mudanças climática promovem e irão promover uma série de variações ou mudanças em diferentes ambientes. Assim, existe uma série de estudos que tentam prever, através de registros do passado, as futuras mudanças e condições desses ambientes. Dessa forma, este trabalho foi um experimento que, por meio de simulações de ambientes com mudanças climáticas, tenta fazer algumas previsões do futuro dos três fatores acima nomeados. Assim a temperatura foi o fator que maiores efeitos negativos teve na sobrevivência das algas. De fato, possivelmente a temperatura seja, provavelmente, o fator que maiores

impactos tenha sobre as espécies de macroalgas (Hale et al. 2011). Assim, estes impactos se traduzem na diminuição do recrutamento tanto de algas não calcáreas como calcáreas (Wernberg et al. 2011). Um exemplo deste fato está sendo observado na costa da Austrália, pois nos últimos anos se tem observado uma diminuição da abundância de algas como no caso de *Macrocystis pyrifera* atribuindo-se como causa o aumento da temperatura da água do mar (Wernberg et al. 2011).

A ausência de diferenças nas respostas fisiológicas entre as duas algas, pode estar relacionada a dois aspectos não previstos inicialmente. Em primeiro lugar o tempo de experimentação pode não ter sido suficiente para que eventuais diferenças fossem expressadas. Em segundo lugar deve-se re-avaliar a taxonomia do grupo utilizando-se ferramentas moleculares, uma vez que as populações do nordeste e sul do Brasil estão isoladas, por processos oceanográficas que derivam em sentidos opostos, a milhares de anos. Portanto seria plausível supor que estando aclimatado a baixas temperaturas por tão longos períodos estas adaptações já estariam presentes no genoma da referida espécie.

O fator pH apresentou interação ainda pouco descrita quando combinado à temperatura elevada. O baixo pH beneficiou a sobrevivência de *L. crispatum* e *S. capensis* quando foram expostas à temperatura elevada, postergando a mortalidade destas algas. Por outro lado e considerando a calcificação dos organismos, o baixo pH estimulou por igual a descalcificação nas duas algas em estudo. Em outro sentido, o incremento da temperatura beneficiou levemente a calcificação nos tratamentos que se encontravam em baixo pH, sendo este um fenômeno pouco conhecido.

Em resumo, a temperatura e o pH foram os fatores que maiores impactos provocaram nas duas espécies em estudo, atuando principalmente de forma aditiva. Por outro lado, os nutrientes não tiveram grande influência sobre a fisiologia das espécies analisadas. Este fato pode ser devido ao pouco tempo de experimentação, de modo que em experimentos com períodos maiores de duração pode-se esperar resultados diferentes. Entretanto, autores como Hale et al. (2011) afirmam que as mudanças de pH e temperatura são importantes forças seletivas que promovem alterações na estrutura e composição das comunidades bentônicas marinhas. Se prevê que nos próximos 90 anos o decréscimo do pH e o aumento da temperatura, e uma consequente perda da diversidade e uma diminuição da abundância principalmente de espécies calcárias (Hale et al 2011).

Em futuros experimentos seria interessante a avaliação dos fatores utilizados neste experimento por maiores períodos de tempo para obter respostas mais claras dos efeitos destes fatores na fisiologia de algas calcificadas. Além disso, é importante o estudo dos impactos dessas variações em campo de forma isolada e de forma conjunta, para assim ter um melhor entendimento das respostas dos efeitos destes fatores. Adicionalmente, outras análises bioquímicas como a análise de anidrase carbônicas são importantes para o melhor entendimento dos efeitos aumento de  $\text{CO}_2$  e da temperatura intracelularmente e as mudanças no metabolismo em ambientes com mudanças.

## 8. Referências

- Andersen J., Schluter L. & Aertebjerg G. (2006) Coastal eutrophication: recent developments in definitions and implications for monitoring strategies. *Journal of Plankton Research* 28(7): 621- 628.
- Basso D. (2012) Carbonate production by calcareous red algae and global change. *Biodiversitas* 34(1): 13- 33.
- Beer S. & Eshel A. (1985) Determining phycoerythrin and phycocyanin concentrations in aqueous crude extracts of red algae. *Australian Journal of Marine & Freshwater Research* 36:785-792.
- Boyce D., Lewis M., Worm B. (2010) Global phytoplankton decline over the past century. *Nature* 466: 591-596.
- Bernhardt J. & Leslie H. (2013) Resilience to Climate Change in Coastal Marine Ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 5(8), 1-8.
- Burdett H., Aloisio E., Calosi E., Findlay H., Widdicombe S., Hatton A. & Kamenos N. (2012). The effect of chronic and acute low pH on the intracellular DMSP production and epithelial cell morphology of red coralline algae. *Marine Biology Research* 8: 756- 763.
- Choi H. G., Kim Y. S., Kim J. H., Lee S. J., Park E. J., Ryu J., Nam K. W. (2006) Effects of temperature and salinity on the growth of *Gracilaria verrucosa* and *Gracilaria chorda*, with the Potential for mariculture in Korea. *Journal of Applied Phycology*, 18(3-5): 269–277.
- Cornwall C., Hepburn C., Pritchard D., Currie K., McGraw C., Hunter K., Hurd C. (2012) Carbon-use strategies in macroalgae: differential responses to lowered pH and implications for ocean acidification. *Journal of Phycology* 48 (1): 137-144.
- Denault M., Stieve E., Valiela I. (2000) Effects of Nitrogen Load and Irradiance on Photosynthetic Pigment Concentrations in *Cladophora vagabunda* and *Gracilaria tikvahiae* in Estuaries of Waquoit Bay. *The biological Bulletin* 199: 233- 225.
- Diaz-Pulido G., Anthony K., Kline D., Dove S., Hoegh-Guldberg O. (2012) Interactions between ocean acidification and warming on the

mortality and dissolution of *coralline* algae. *Journal of Phycology* 48: 32-39.

Doney S., Fabry V., Feely R., Kleypas J. (2009) Ocean Acidification: The Other CO<sub>2</sub> Problem. *Annual Review of Marine Science* 1: 169-92

Duarte C., Nixon S., Dennison W., Valiela I., Hughes T., Bordalba N. (2009) Global loss of coastal habitats: rates, causes and consequences. *Editorial Fundação BBVA* . 60 pp.

Fabry, V., Seibel, B., Feely, R., Orr, J. (2008) Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *Journal of Marine Science* 65, 414-432.

Faxneld S., Jørgensen T., Tedengren M. (2010) Effects of elevated water temperature, reduced salinity and nutrient enrichment on the metabolism of the coral *Turbinaria mesenterina*. *Coastal and Shelf Science* 88, 482-487.

Feely R., Sabine C., Lee K., Will B., Kleypas J., Fabry V., Millero F. (2003) Impact of Anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> System in the Oceans. *Science* 305: 362-366.

Foster M., (2001) Rodolith: between rocks and softs place. *Journal of Phycology* 37: 659: 667.

Gao K., Aruga Y., Asada K., Ishihara T., Akano T., Kiyohara M., (1993) Calcification in the articulated coralline alga *Corallina pilulifera*, with special reference to the effect of elevated CO<sub>2</sub> concentration. *Marine Biology* 117: 129- 132.

Gao K. & Zheng Y. (2010) Combined effects of ocean acidification and solar UV radiation on photosynthesis, growth, pigmentation and calcification of the coralline alga *Corallina sessilis* (Rhodophyta). *Global Change Biology* 16: 2388- 2398.

Grasshoff, K., Ehrhardt, M.; Kremling, K. *Methods of seawater analysis*. 2. ed. Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1983.

Gordillo F., Aguilera J., Jimenez C. (2006) The response of nutrient assimilation and biochemical composition of Arctic seaweeds to a

nutrient input in summer. *Journal of Experimental Botany* 57(11): 2661-2671.

Hale R., Calosi P., McNeill L., Mieszkowska N., Widdicombe S. (2011) Predicted levels of future ocean acidification and temperature rise could alter community structure and biodiversity in marine benthic communities. *Oikos* 120: 661-674.

Hall-Spencer J.M., Rodolfo Metalpa R., Martin S. (2008) Volcanic carbon dioxide vents reveal ecosystem effects of Ocean acidification. *Nature* 454: 96- 99.

Halpern B.S., Walbridge S., Selkoe k A., Kappel C.V., Micheli F., D'agrosa C., Bruno J.F., Casey K..S., Ebert C., Fox H.E., FujitaR., Heinemann D., Lenihan H.S., Madin E., Perry M., Selig E., Spalding M., Steneck R., Watson R. ( 2008) A Global Map of Human Impact on Marine Ecosystems. *Science* 319: 948-952.

Henry R. *Metabolismo de ecossistemas aquáticos fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas.* Instituto de Biociências (IBB). Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Botucatu. Botucatu, SP, Brasil 1994.

Honisch B., Ridgwell A, Schmidt D., Thomas E., Gibbs S., Sluijjs A., Zeebe R., Kump L., Martindale R., Greene S., Kiessling W., Ries J., Zachos J., Royer D., Barker S., Marchitto T., Moyer R, Pelejero C., Ziveri P., Foster G, Williams G. (2012) The Geological Record of Ocean Acidification. *Science* 335: 1058- 1063.

Hurd C., Hepburn C., Currie K., Raven J., Hunter K. (2009) Testing the effects of ocean acidification on algal metabolism considerations for experimental designs. *Journal of Phycology* 45: 1236-1251.

Johnson V., Russell B., Fabricius K., Brownlee C., Hall-Spencer M. (2012) Temperate and tropical brown macroalgae thrive, despite decalcification, along natural CO<sub>2</sub> gradients. *Global Change Biology* 18: 2792- 2803.

Jokiel P., Rodgers K., Kuffner I., Anderson A., Cox E., Mackenzie F. (2008) Ocean acidification and calcifying reef organisms: a mesocosm investigation. *Coral Reefs* 27: 473–483.

- Jury C., Whitehead R., Szmant A. (2010) Effects of variations in carbonate chemistry on the calcification rates of *Madracis auretenra* (= *Madracis mirabilis* sensu Wells, 1973): bicarbonate concentrations best predict calcification rates. *Global Change Biology* 16: 1632- 1644.
- Kug J-S., An S-I., Ham Y-G., Kang I-S. (2010) Changes in El Niño and La Niña teleconnections over North Pacific–America in the global warming simulations. *Theory and Applied Climatological* 100: 275-282.
- Lathan H. (2008) Temperature stress-induced bleaching of the coralline alga *Corallina officinalis*: a role for the enzyme bromoperoxidase. *Biosciencehorizons* 1(2): 104-113
- Luo M., Liu F., Xu Z. (2012) Growth and nutrient uptake capacity of two co-occurring species, *Ulva prolifera* and *Ulva linza*. *Aquatic Botany* 100: 18-24.
- Martinez B., Rico J., (2004) Inorganic nitrogen and phosphorus uptake kinetics in *Palmaria palmata* (rhodophyta). *Journal of Phycology* 40, 642-650.
- Martin S., Gattuso J.P. (2009) Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature. *Global Change Biology* 15: 2089-2100.
- Martins C., Arantes N., Faveri C., Batista M., Oliveira E., Pagliosa P., Fonseca A., Nunes J., Chow F., Pereira S., Horta P. (2012) The impact of coastal urbanization on the structure of phytobenthic communities in southern Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 64: 772- 778
- Millero F., Lee K., Roche M. (1998) Distribution of alkalinity in the surface waters of the major Oceans. *Marine Chemistry* 60: 111- 130.
- Noisette F., Duong G., Six C., Davoult D., Martin S.(2013) effects of elevated  $p\text{CO}_2$  on the metabolism of a temperate rhodolith *Lithothamnion corallioides* grown under different temperatures. *Journal of Phycology* 49: 746- 757.

Nordell B. (2003) Thermal pollution causes global warming. *Global and Planetary Change* 38: 305-312.

Pascelli C., Riul P., Riosmena- Rodriguez R., Scherner F., Nunes M., Hall- Spencer J., Cabral de Oliverira E., Horta P. Seasonal and depth-driven changes in rhodolith bed structure and associated macroalgae off Arvoredo island (southeastern Brazil) *Aquatic Botany* AQBOT2576.

Porzio L., Buia M. C., Hall-Spencer J. M. (2011) Effects of ocean acidification on macroalgal communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 278–287.

Reynaud S., Leclercq N., Romaine-Lioud S., Ferrier-Pages C. Jaubert J., Gattuso J.P. (2003) Interacting effects of CO<sub>2</sub> partial pressure and temperature on photosynthesis and calcification in a scleractinian coral. *Global Change Biology* 9: 1660–1668.

Richardson A., (2008) In hot water: Zooplankton and climate change. *Journal of Marine Science* 65, 279-295.

Ritchie R.J. (2008) Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* 46(1): 115- 126.

Riul P., Lacouth P., Pagliosa P., Christoffersen M., Horta P. (2009) Rhodolith beds at the eastern most extreme of South America: Community structure of an endangered environment. *Aquatic Botany* 90: 315-320

Roleda M., Boyd P., Hurd C. (2012) Before ocean acidification: calcifier chemistry lessons. *Journal of Phycology* 48, 840-843.

Rodolfo-Metalpa R., Martin S., Ferrier-Pages C., Gattuso J.P. (2009) Response of the temperature coral *Cladocora caespitosa* to mid- and long-term exposure to pCO<sub>2</sub> and temperature levels projected in 2100. *Biogeosciences Discussions* 6: 7103–7131.

Rodolfo-Metalpa R., Houlbrèque F., Tambutté E., Boisson F., Baggini C., Patti F., Jeffree R., Fine M., Foggo A., Gattuso J.P., Hall-Spencer



J.M. (2011) Coral and mollusc resistance to ocean acidification adversely affected by warming. *Nature Climate Change* 1: 308-312.

Russell B., Thompson J-A., Falkenberg L., Connell S. (2009) Synergistic effects of climate change and local stressors: CO<sub>2</sub> and nutrient-driven change in subtidal rocky habitats. *Global Change Biology* 15: 2153–2162.

Sabine C., Tanhua T. (2010) Estimation of Anthropogenic CO<sub>2</sub> Inventories in the Ocean. *The Annual Review of Marine Science* 2: 175-198.

Scherner F., Bonomi J., Horta P. (2012) Photosynthetic response of two seaweed species along an urban pollution gradient: evidence of selection of pollution-tolerant species. *Marine Pollution Bulletin* 64: 2380- 2390.

Schuldt J., Konrath S., Schawarz X., (2011) “global warming” or “climate change”? whether the planet is warming depends on question wording. *Public Opinion Quarterly* 75: 115-124.

Shi W., Wang S., Yang Q., (2010) Climate change and global warming. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 9: 99-102

Semesi S., Kangwe J., Bjork M. (2009) Alterations in seawater pH and CO<sub>2</sub> affect calcification and photosynthesis in the tropical coralline alga, *Hydrolithon* sp. (Rhodophyta). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 84: 337–341.

Sinutok S., Hill, R., Doblin M.A., Kuhl M., Ralph P.J. (2012) Microenvironmental changes support evidence of photosynthesis and calcification inhibition in *Halimeda* under ocean acidification and warming. *Coral Reefs* 31 (4): 1201-1213.

Smith A.M., Sutherland J.E., Kregting L., Farr T.J., Winter D.J. (2012) Phylomineralogy of the Coralline red algae: Correlation of skeletal mineralogy with molecular phylogeny. *Phytochemistry* 81: 97-108.

Steffen W., Persson A., Deutsch L., Zalasiewicz J., Williams M., Richardson K., Crumley C., Crutzen P., Folke C., Gordon L., Molina M., Ramanathan V., Rockström J., Scheffer M., Schellnhuber H. J.,

Svedin U., (2011) The Anthropocene: from global change to planetary stewardship. *Ambio* 40 (7): 739- 761.

Steller D.L., Hernandez-Ayon J.M., Riosmena-Rodriguez R., Cabello-Pasini A. (2007) Effects of UVB radiation on the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales): Changes in cell organization, growth and photosynthetic performance. *Ciencias Marinas* 33(4): 441-456.

Teichberg M., Fox S., Olsen Y., Valiela I., Martinetto P, Iribarnes O., Yuriko- Muto E., Petti M., Corbisier T., Soto – Jimenez M., Paez-Osuna F., Castro P., Freitas H., Zitelli A., Cardinaletti M., Tagliapietras D. (2010) Eutrophication and macroalgal blooms in temperate and tropical coastal waters: nutrient enrichment experiments with *Ulva* spp. *Global Change Biology* 16: 2624-2637.

Teichert S., Woelkerling W., Rugeberg A., Wisshak M., Piepenburg D., Meyerhofer M., Form A., Budenbender J., Freiwald A. (2012) Rhodolith beds (Corallinales, Rhodophyta) and their physical and biological environment at 806319N in Nordkappbukta (Nordaustlandet, Svalbard Archipelago, Norway). *Phycology* 51(4): 371-390.

Tréguer P. & Le Corre P. (1976) *Manual de analyses de nutriments de água de mar*. Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, 110pp.

Tyrell T. (2008) Calcium carbonate cycling in future oceans and its influence on future Climates. *Journal of Plankton Research* 30(2), 141-156.

Viaroli P., Bartoli M., Azzoni R., Giordani G., Mucchino C., Naldi M., Nizzoli D., Tajé L. (2005) Nutrient and iron limitation to *Ulva* blooms in a eutrophic coastal lagoon (Sacca di Goro, Italy). *Hydrobiologia* 550: 57-71.

Wernberg T., Russell B., Moore P., Ling S., Smale D., Campbell A., Coleman M., Steinberg P., Kendrick Connell S. (2011) Impacts of climate change in a global hotspot for temperature marine Biodiversity and ocean warming. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* 400: 7-16.

Wernberg T., Smale D., Thomsen M. (2012) A decade of climate change experiments on marine organisms: procedures, patterns and problems. *Global Change Biology* 18: 1491- 1498.

Wu H., Zou D., Gao K. (2008) Impacts of increased atmospheric CO<sub>2</sub> concentration on photosynthesis and growth of micro- and macro-algae. *Science in China Series C: Life sciences* 51(12): 1144-1150.

Zehr J. & Kudela R. (2011) Nitrogen Cycle of the Open Ocean: From Genes to Ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 3: 197-225.