



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

MESTRADO EM GESTÃO E CONSERVAÇÃO DA NATUREZA

**Os efeitos do aumento das concentrações  
de dióxido de carbono e da turbulência  
na diatomácea, *Chaetoceros* sp..**



Elaborado por:  
Patrícia Alexandra Borges Guerra

Abril de 2014

Orientadores:  
Professor Doutor Eduardo Brito de Azevedo  
Doutora Joana Barcelos e Ramos



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

MESTRADO EM GESTÃO E CONSERVAÇÃO DA NATUREZA

**Os efeitos do aumento das concentrações  
de dióxido de carbono e da turbulência  
na diatomácea, *Chaetoceros* sp..**

Tese de Mestrado

Elaborado por:  
Patrícia Alexandra Borges Guerra

Abril de 2014

Orientadores:  
Professor Doutor Eduardo Brito de Azevedo  
Doutora Joana Barcelos e Ramos

## Índice:

• <u>Agradecimentos</u> .....	1
• <u>Resumo</u> .....	3
• <u>Introdução</u> .....	4
1. Aumento da poluição atmosférica e repercussões para o Oceano .....	4
2. Efeitos do aumento da concentração de CO <sub>2</sub> no sistema de carbono do Oceano .....	5
3. Fitoplâncton .....	6
4. Efeito do aumento do CO <sub>2</sub> no fitoplâncton .....	8
5. Parâmetros que afectam o crescimento do fitoplâncton .....	8
5.1. CO <sub>2</sub> .....	8
5.2. Luz .....	9
5.3. Turbulência .....	9
6. Gestão e Conservação da Natureza .....	10
Objectivo do estudo .....	12
• <u>Material e Métodos</u> .....	13
1. Condições de cultura .....	13
2. Desenho experimental .....	13
3. Parâmetros analisados .....	16
3.1. Sistema de Carbono .....	16
3.2. Alcalinidade Total .....	16
3.3. pH .....	17
3.4. Nutrientes .....	18
3.4.1. Fosfato (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) .....	18
3.4.2. Nitrito (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	18
3.4.3. Nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) .....	18
3.4.4. Silicato (Si(OH) <sub>4</sub> -Si) .....	19
3.5. Matéria Orgânica Particulada (POM) .....	19
3.5.1. Fósforo orgânico particulado (POP) .....	19

3.5.2. Carbono orgânico particulado (POC) e azoto orgânico particulado (PON).....	20
3.6. Contagem de células.....	20
• <u>Resultados</u> .....	22
1. Sistema de Carbono.....	22
2. Nutrientes.....	24
3. Biomassa.....	28
4. Matéria Orgânica Particulada.....	29
5. Crescimento.....	31
6. Ratios de matéria orgânica particulada.....	32
7. Conteúdos celulares.....	35
• <u>Discussão</u> .....	38
1. Efeito do aumento da concentração do CO <sub>2</sub> no <i>Chaetoceros</i> sp. ....	38
2. O efeito da turbulência.....	40
3. O efeito combinado.....	40
4. Implicação para o ecossistema, gestão e conservação da natureza.....	41
5. Problemas encontrados e perspectivas futuras.....	42
• <u>Bibliografia</u> .....	44

## **Agradecimentos:**

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, garantidamente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Gestão e Conservação da Natureza me ajudaram, directa ou indirectamente, a cumprir os meus objectivos e a realizar esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo apenas algumas palavras, poucas, mas um sentido e profundo sentimento de reconhecido agradecimento.

Aos meus orientadores, Professor Doutor Eduardo Brito de Azevedo, que agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em realizar esta Tese que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação académica e científica. À Doutora Joana Barcelos e Ramos por me ter proporcionado as condições necessárias para a elaboração da minha Tese e por permitir a minha integração no CCMMG (Centro do Clima, Meteorologia e Mudanças Globais). Agradeço também a sua simpatia, disponibilidade, apoio incondicional, incentivo, boa disposição e paciência.

À Francesca Gallo, um Muito Obrigada por estar sempre presente. Agradeço, de forma especial, a ajuda, o apoio e a preocupação, principalmente nos momentos de maior aflição e nas alturas de desânimo.

À Sonia Blanco-Ameijeiras que, na fase inicial do meu projecto, meu deu uma ajuda preciosa e me ensinou algumas das técnicas que utilizei.

Ao Francisco Reis, pela paciência e excelente trabalho e ajuda em construir a plataforma que eu imaginei para aplicar o factor turbulência nas garrafas das culturas.

À Vanessa pelos intermináveis desabafos, amizade, companhia e ajuda. Obrigada por estares sempre presente!

Ao Isaac, um agradecimento muito especial pelo apoio e carinho diários, pelas palavras de confiança e de força, em todos os momentos e pela enorme paciência. Por tudo, e por estares na minha vida, Muito Obrigado!

À Minha Família, em especial aos Meus Pais, Irmã, Sobrinho, à Minha Madrinha e ao Tó, um enorme Obrigada por acreditarem sempre em mim e de me apoiarem nas minhas decisões. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente me oferecem. A eles, dedico este trabalho.

A todos, enfim, reitero o meu apreço e a minha gratidão!

## **Resumo:**

Na natureza existem fontes naturais emissoras de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Com a revolução industrial as emissões antropogénicas provocaram um desequilíbrio no ciclo do carbono da Terra, pois adicionam uma reserva que naturalmente não estaria disponível actualmente. Há medida que a concentração de CO<sub>2</sub> aumenta na atmosfera, entra em equilíbrio com a superfície dos oceanos por trocas entre a fase gasosa e a fase líquida, aumentando a concentração de CO<sub>2</sub> nas camadas superficiais dos oceanos. Como tal, aqui estudou-se o potencial efeito das concentrações do CO<sub>2</sub> numa espécie de fitoplâncton pertencente ao grupo das diatomáceas, o *Chaetoceros* sp.. Ao mesmo tempo foi aplicado um factor turbulência para verificar se esta espécie reagia de forma diferente, uma vez que o oceano não é estático e tem bastante movimentação devido a correntes, vento, ondulação, etc.

Foram usadas 3 concentrações diferentes de CO<sub>2</sub>, sendo elas 450, 925 e 1205 µatm, conseguidas com a alteração do sistema de carbono. Estas três concentrações têm como objectivo simular as concentrações de CO<sub>2</sub> existentes no oceano no presente, futuro e um futuro distante, respectivamente. Durante a fase de pré-culturas e culturas fez-se a adaptação da espécie às três concentrações de CO<sub>2</sub> e ao mesmo tempo à turbulência. Neste estudo verificou-se que quer o aumento da concentração do CO<sub>2</sub>, quer a turbulência não tiveram influência no desenvolvimento da espécie o que se pode verificar nos dados obtidos no crescimento celular, cotas celulares e ratios.

Os *Chaetoceros* sp, desenvolveram-se bem nos meios com e sem turbulência, assim como nos meios com maior concentração de CO<sub>2</sub> e cheguei á conclusão que são uma espécie bastante robusta e com grande capacidade de adaptação às diferentes condições a que foram expostos na experiência. Apesar de esta espécie ter tido uma boa reacção ao aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> e de no geral não ser sensível, sabe-se que este aumento faz com que a espécie de diatomácea dominante mude e como tal não se sabe exactamente como irão reagir as restantes espécies de diatomáceas, o fitoplâncton e se poderá ter alguma influência na cadeia trófica.

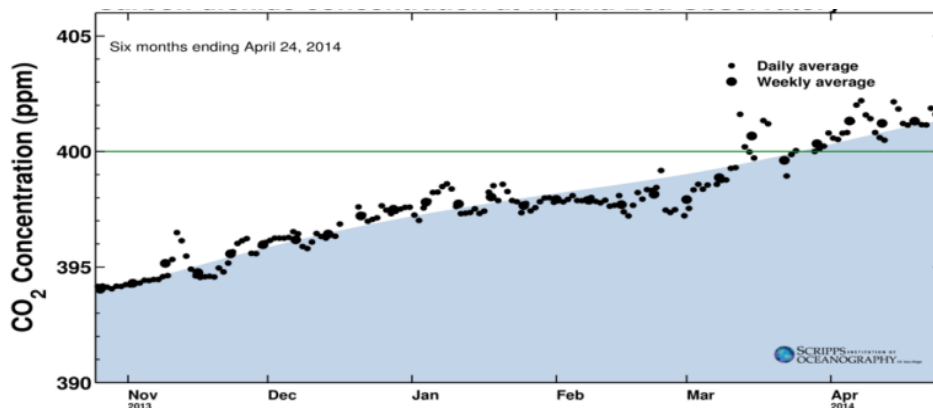
## **Palavras- chave:**

CO<sub>2</sub>, turbulência, *Chaetoceros* sp., diatomáceas, fotossíntese, fitoplâncton.

## Introdução:

### 1. Aumento da poluição atmosférica e repercussões para o oceano

Com o desenvolvimento da actividade industrial durante o século passado nomeadamente devido à utilização de combustíveis fósseis como o carvão mineral e os derivados do petróleo (gasolina e diesel), assim como a produção de resíduos orgânicos (lixos), fez com que a poluição ambiental fosse aumentando ao longo dos anos. De facto, a queima de combustíveis fósseis é responsável pela libertação de monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), gás metano (CH<sub>4</sub>), perfluorcarbonetos (PFC's), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e hidrofluorcarbonetos (HFC's) na atmosfera. Para além das fontes anteriormente referidas existem também fontes naturais de dióxido de carbono atmosférico que incluem os vulcões, a combustão de matéria orgânica, incêndios florestais e a respiração por organismos aeróbios. As concentrações de dióxido de carbono na atmosfera são naturalmente reguladas no ciclo do carbono por uma série de processos, tais como a fotossíntese e a remineralização da matéria orgânica onde o carbono flui entre a atmosfera, a terra e os oceanos. Contudo, as emissões antropogénicas provocam um desequilíbrio no ciclo do carbono da Terra, pois adicionam uma reserva que naturalmente não estaria disponível actualmente. Há medida que a concentração de CO<sub>2</sub> aumenta na atmosfera (Figura 1), entra em equilíbrio com a superfície dos oceanos por trocas entre a fase gasosa e a fase líquida, aumenta a concentração de CO<sub>2</sub> nas camadas superficiais dos oceanos.



**Figura 1** - Concentrações do dióxido de carbono na atmosfera global ultrapassou as 400 partes por milhão (ppm) pela primeira vez na história da



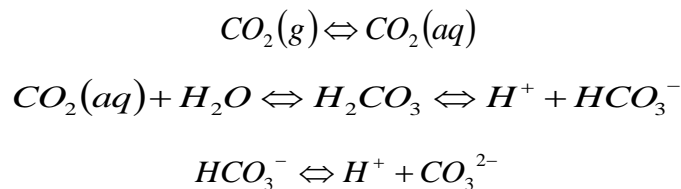
humanidade. Dados publicados pelos Observatório do Mauna Loa, dos últimos 6 meses (<http://keelingcurve.ucsd.edu/>).

No oceano profundo as observações sugerem que outros processos (por exemplo, mudanças na circulação oceânica) podem ter um forte impacto, na mudança da química do oceano em regionalmente numa escala de tempo anual até décadas (IPCC, 2011). Contudo águas superficiais, ricas em CO<sub>2</sub>, afundam em pontos do oceano como por exemplo, no Atlântico Norte (circulação termohalina) aumentando a concentração de CO<sub>2</sub> também em profundidade.

## **2. Efeitos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> no sistema de carbono do oceano**

O oceano tem um papel importante na modulação através da absorção de CO<sub>2</sub> da atmosfera. Entre 1800 e 1994, quase 50% do CO<sub>2</sub> emitido pela combustão de combustíveis fósseis, isto é 118 petagramas de carbono (Pg=10<sup>15</sup>g), foram absorvidos pelo oceano (Sabine *et al.*, 2004), atingindo actualmente uma média global à superfície dos oceanos de 393 partes por milhão (ppm) (Tans *et al.*, 2012).

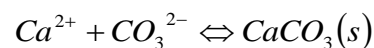
A retenção de CO<sub>2</sub> por parte do oceano modifica o balanço químico da água do mar através do equilíbrio termodinâmico CO<sub>2</sub> com a água do mar (Rhein *et al.*, 2013). Mais especificamente, quando o CO<sub>2</sub> é dissolvido no oceano, reage com a água do mar e forma ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) que é um ácido fraco, sendo esta reacção muito rápida e difícil de detectar. Este posteriormente vai dissociar-se em bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e protões (H<sup>+</sup>) de acordo com as equações abaixo.



A acidificação dos oceanos faz com que exista uma mudança na distribuição dos componentes do sistema de carbono, levando a um aumento de iões bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e protões (H<sup>+</sup>) e um défice de iões carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>).

Actualmente a água do mar é ligeiramente alcalina, com um pH médio próximo de 8 (Brown *et al.*, 1989). Com o aumento das concentrações de CO<sub>2</sub> o pH diminui, devido ao aumento da concentração do ião H<sup>+</sup> e espera-se que atinja aproximadamente 7.9 (IPCC, 2007) segundo o cenário “business as usual” (IS92a) no ano 2100. A este decréscimo do pH médio chama-se acidificação dos oceanos e é um dos factores de stress que afectam os ecossistemas no oceano (IPCC, 2011). O pH varia geograficamente e sazonalmente, podendo atingir valores de 7.5 ou menos em águas com salinidade reduzida ou em condições anaeróbias, isto é sem a presença de oxigénio (Brown *et al.*, 1989).

O decréscimo do ião carbonato, reduz a profundidade de compensação dos carbonatos, abaixo da qual o carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>), inclusive o que faz parte da constituição dos organismos (por exemplo as conchas) vai começar a dissolver de forma a ser recuperado o equilíbrio de iões.



Assim os organismos produtores de CaCO<sub>3</sub>, dependem do estado de saturação em CaCO<sub>3</sub> ( $\Omega$ ) no oceano para a produção das suas conchas (como por exemplo os coccolitóforos, foraminíferos, corais, bivalves, etc). A título de exemplo, para uma atmosfera onde a pressão parcial de CO<sub>2</sub> ( $pCO_2$ ) é de 560  $\mu$ atm a respectiva redução do pH faz com que exista uma diminuição na calcificação de cerca de 5 a 25% (Feely *et al.*, 2004).

### 3. Fitoplâncton

O termo fitoplâncton refere-se a organismos autotróficos planctónicos com capacidade de captar luz (energia na sua forma primária) e, através do processo de fotossíntese, usá-la para fixar dióxido de carbono produzindo matéria orgânica (açúcares), com assimilação de nutrientes que se encontram disponíveis no oceano. Por outras palavras, durante a fotossíntese o fitoplâncton usa a energia do sol para transformar dióxido de carbono e água em alimento. Este processo remove o CO<sub>2</sub> a partir de água do mar, aumentando a capacidade de remoção de CO<sub>2</sub> da atmosfera.

O fitoplâncton é um bom indicador de um ambiente aquático saudável. Os produtores primários em águas abertas são muito pequenos, e não constroem um quadro estrutural relativamente persistente como a vegetação terrestre (Margalef,

1997), uma vez que não têm dimensões nem estão fixos num local, sendo levados pelas correntes.

Quase metade da produção primária marinha é efectuada pelo fitoplâncton (Field *et al.*, 1998). Como principal fonte de alimento para o zooplâncton, o fitoplâncton está na base da cadeia alimentar marinha. Seres vivos cada vez maiores desde zooplâncton, peixes e mamíferos estão dependentes do fitoplâncton para a sua sobrevivência.

As restrições mais importantes para o desenvolvimento do fitoplâncton além do carbono, são a intensidade luminosa, salinidade e disponibilidade de nutrientes. Os dois nutrientes que o fitoplâncton utiliza em maiores concentrações são o azoto e o fósforo. A taxa de produção de matéria orgânica pelo conjunto de produtores primários determina a taxa de fluxo de energia e toda a produção de todos os níveis tróficos em quase todo o ecossistema (Falkowski *et al.*, 2007). Uma vez que quanto mais açúcar uma célula tiver disponível mais energia tem e maior desenvolvimento celular, quanto maior a abundância de fitoplâncton mais alimento têm os restantes seres nos seguintes níveis tróficos.

Existem espécies de vários grupos funcionais como as cianobactérias, as diatomáceas envolvidas por estruturas de sílica, os dinoflagelados e os cocolitóforos revestidos com placas calcárias.

As diatomáceas são dos grupos mais comuns de fitoplâncton, com vários milhares de espécies e com os mais diversos tamanhos (Dürselen *et al.*, 2010). As diatomáceas são organismos que podem ser encontradas isoladas, ou em colónias. Uma característica das diatomáceas é estarem envoltas por uma parede constituída de sílica chamada de frústula. Estas frústulas, constituídas por duas partes mostram uma grande diversidade na forma.

A diatomácea que foi utilizada neste trabalho, é o *Chaetoceros* sp. (Figura 2). Existem cerca de 180 espécies marinhas desta diatomácea. Esta, pode ser encontrada isolada ou em colónia. Habitualmente as colónias estão reunidas em cadeias mais ou menos longas, que podem ser direitas, curvas ou em espiral (Sournia, 1986).



**Figura 2** - Imagens de *Chaetoceros* sp. semelhantes aos da minha experiência (oceano.org; marinespecies.org; micro.sakura.ne.jp).

#### **4. Efeito do aumento do CO<sub>2</sub> no fitoplâncton.**

O previsto aumento do CO<sub>2</sub> na água do mar poderá ter efeitos na fisiologia das diatomáceas. De facto vários estudos, (Ihnken *et al.*, 2011), demonstram que as diatomáceas aumentam a sua capacidade fotossintética a concentrações de CO<sub>2</sub> elevadas. Contudo, outros parâmetros como o número de divisões celulares têm demonstrado respostas opostas em relação ao aumento do CO<sub>2</sub> disponível (Ihnken *et al.*, 2011), indicando a necessidade de aprofundar os mecanismos envolvidos na resposta ao aumento de CO<sub>2</sub>. Uma das respostas a este aumento é o aumento do comprimento das cadeias como estratégia apresentada pela, diatomácea, *Asterionellopsis glacialis* que poderá ser vantajoso num cenário futuro de elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> (Barcelos e Ramos *et al.*, 2014).

#### **5. Parâmetros que afectam o crescimento do fitoplâncton.**

##### **5.1. CO<sub>2</sub>:**

As diatomáceas contribuem com quase metade (45%) da produtividade primária marinha e são conhecidas como assimiladoras activas tanto do CO<sub>2</sub> como de bicarbonato para a fotossíntese de forma a contrariar a pouca disponibilidade de CO<sub>2</sub> no oceano relativamente aos requisitos da enzima que promove a fixação de CO<sub>2</sub> (ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase oxigenase - RubisCO) (Wu *et al.*, 2010). Algumas espécies de diatomáceas mostram claramente capacidade de usar bicarbonato para adquirir carbono inorgânico através de um ou múltiplos mecanismos de concentração de carbono (Ihnken *et al.*, 2011).

De forma a evitar o risco de limitação de carbono, a maioria das microalgas tem assim desenvolvido vários mecanismos que aumentam a concentração do CO<sub>2</sub> na vizinhança do RubisCO (Badger *et al.*, 1998, Thoms *et al.*, 2001). Nas últimas duas

décadas, foram feitos significativos progressos no que consta a compreensão dos mecanismos de concentração de CO<sub>2</sub> (CCMs). Muitas microalgas têm demonstrado possuir um complexo CCMs que envolve a captação de CO<sub>2</sub> e/ou HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, assim como várias isoformas da enzima anidrase carbónica (CA), que aceleram a conversão, de outra forma lenta, entre estas espécies de carbono (Rost *et al.*, 2008).

## **5.2. Luz:**

Para além do aumento do CO<sub>2</sub> e do decréscimo do pH, outro parâmetro relevante nas mudanças globais é a temperatura média global da superfície dos oceanos, que está dependente da composição da atmosfera, ou seja da insolação, radiação que efectivamente atinge a superfície da Terra e que determina a quantidade de calor irradiado para a atmosfera. Na superfície do oceano, o calor é transferido por processos de condução, convecção e pelos efeitos da evaporação. Sempre que existe evaporação há libertação de calor. Esse aumento da temperatura da superfície dos oceanos poderá aumentar a estratificação média mantendo o plâncton mais á superfície e aumentando a quantidade de luz a que está exposto.

A propagação da luz, em profundidade no oceano, vai diminuindo exponencialmente (atenuação) e tem duas causas principais a absorção e a dispersão. A zona iluminada onde a intensidade da luz é suficiente para a produção fotossintética primária que leva ao crescimento de organismos autotróficos é chamada de zona fótica. Assim, quanto maior a claridade da água e o ângulo dos raios solares em relação á superfície do oceano, maior a profundidade que a luz penetra e maior a profundidade a que é possível acontecer a fotossíntese. Entre a zona fótica e o fundo marinho existe a zona afótica onde os organismos fotossintéticos não conseguem sobreviver (Brown *et al.*, 1989).

A adaptação e capacidade de sobrevivência de uma espécie a várias condições ambientais determinam o nicho em que diferentes espécies poderão prosperar favoravelmente (Ihnken *et al.*, 2011).

## **5.3. Turbulência:**

O movimento laminar e turbulento da água é gerado no oceano através de mistura efectuada pelo vento, marés e estratificação das massas de água em diferentes escalas de tempo e espaço (Svendsen, 1997).

A turbulência consiste em movimentos irregulares das moléculas num fluido, por meio do qual a energia mecânica é transmitida e decai. Através deste mecanismo, o transporte de calor e de materiais em solução é acelerada ao longo dos respectivos gradientes. O fitoplâncton ocorre numa camada superior do mar na zona fótica, geralmente 40-80m de espessura (Margalef, 1997), e a matéria orgânica formada entra na cadeia alimentar que se estende até às profundidades máximas. A energia turbulenta, originada principalmente pela interacção entre a atmosfera e a água à superfície, desempenha um papel fundamental na mistura dos nutrientes horizontalmente e verticalmente até chegar a águas profundas (Margalef, 1997).

O efeito da turbulência de pequena escala nos diferentes grupos de plâncton pode afectar toda a cadeia alimentar planctónica e, portanto, o sentido do fluxo de carbono no sistema. Por isso, é importante estudar o impacto da turbulência em comunidades planctónicas (Petersen *et al.*, 1998). Em ecossistemas com limitação de nutrientes, a interacção entre turbulência, células e os nutrientes (do fitoplâncton), em pequena escala é importante para a compreensão da dinâmica de todo o ecossistema (Peters *et al.*, 2006).

O fitoplâncton no oceano está continuamente a ser sujeito a várias forças geradas pela turbulência de pequena escala. A turbulência de pequena escala pode ser benéfica para o fitoplâncton uma vez que aumenta a taxa de difusão de nutrientes na superfície celular, sendo assim significativa apenas para o fitoplâncton com maiores dimensões (Sullivan *et al.*, 2003) De acordo com Peters *et al.*, (2000), as taxas de crescimento são, em geral, afectadas negativamente pela turbulência e pode interferir com uma série de processos biológicos, principalmente relacionado com a distribuição de grandes quantidades de células na água.

## **6. Gestão e Conservação da Natureza**

No âmbito da gestão e conservação da natureza este projecto tem bastante importância uma vez que apesar do já considerável número de estudos a decorrer sobre o tema e de já existirem algumas conclusões, ainda é extremamente difícil prever exactamente as verdadeiras consequências das alterações climáticas. Nomeadamente com o aumento do CO<sub>2</sub>, mais especificamente no oceano e em todos os seres existentes no ecossistema marinho. Posteriormente quais serão as consequências para nós humanos por exemplo a nível de alimentação,

nomeadamente nós portugueses em que faz parte da nossa dieta variada uma elevada quantidade de bens provenientes do mar. Mas também a nível mundial onde as populações dos países que vivem junto às zonas costeiras e onde o mar é sua principal fonte de subsistência. Mais especificamente aqui nos Açores, onde a observação de Cetáceos e actividades relacionadas com o mergulho dependem bastante do bem-estar e da abundância do ecossistema marinho de forma a poder proliferar e ajudar à promoção da sua conservação.

As alterações climáticas influenciam a pesca através dos seus efeitos na produção primária, interacções na cadeia alimentar e no ciclo de vida e distribuição das espécies alvo (Blanchard *et al.*, 2012; Brander, 2007) as alterações na produção primária são acompanhadas de alterações químicas e físicas do meio (Sarmiento, 2004).

A zona litoral constitui um recurso insubstituível, finito e não renovável à escala humana. Actualmente, o litoral português é sob o ponto de vista dos recursos extraordinariamente rico, mas possui mecanismos de gestão desarticulados baseados num fraco apoio científico e geridos por um vasto conjunto de entidades com objectivos e conhecimentos insuficientes. Como tal, o importante recurso constituído pelo litoral português deveria ser sujeito a uma gestão cuidada, baseada num conhecimento científico aprofundado. Só assim é possível ter um desenvolvimento sustentável, continuando a tirar proveito dos amplos recursos existentes na zona costeira (Dias *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, na tentativa de controlar as concentrações cada vez maiores de dióxido de carbono, a maioria dos países industrializados tem tomado iniciativas para manter o seu nível de emissões. Uma das iniciativas mais importantes é o Protocolo de Quioto, um acordo internacional entre 169 países, que assinaram um tratado jurídico internacional que explicitamente pretende limitar as emissões quantificadas de gases com efeito de estufa dos países desenvolvidos. Para atingir esses objectivos, um mercado de negociação foi criado, o que permite que os países que têm unidades de emissão de sobra, possam vender este excesso de capacidade para os países que requerem mais de seus alvos. Assim, uma nova mercadoria foi criada na forma de reduções de emissões ou remoções. Neste âmbito, o dióxido de carbono assume um novo significado: o problema torna-se uma boa oportunidade, e os países que promovem investimentos em pesquisa, eventualmente, tornam-se vendedores para o "mercado de carbono". O comércio de emissões é um instrumento

para a execução do propósito do princípio do poluidor-pagador; premeia a prevenção em detrimento da solução de fim-de-linha; e, ao basear-se sobre um valor-limite informado pela ciência, a sua utilização em problemas ambientais cujo impacte e extensão é extremamente incerto e parece particularmente adequada ([www.apambiente.pt](http://www.apambiente.pt)).

## **Objectivo do estudo;**

Neste projecto pretendia-se avaliar, independentemente os potenciais efeitos das concentrações do CO<sub>2</sub> e da turbulência no *Chaetoceros* sp., importante organismo fotossintético para os ciclos biogeoquímicos. Mais especificamente, pretendeu-se:

1. Determinar efeitos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e consequentes mudanças no sistema de carbono da água do mar nas:

- Taxas de crescimento
- Conteúdos celulares
- Nutrientes inorgânicos dissolvidos
- Matéria orgânica particulada
- Ratios da matéria orgânica particulada

2. Determinar efeitos da turbulência:

- Verificar se existia alguma diferença nos parâmetros referenciados acima nos meios onde foi aplicado o factor turbulência comparando com os meios onde não foi aplicado esse factor.

3. Determinar o efeito combinado:

- Verificar se se observava alguma diferença nos vários parâmetros estudados simultaneamente com o aumento do CO<sub>2</sub> e com o efeito da turbulência.

4. Implicação para o ecossistema, gestão e conservação da natureza:

Esta espécie foi escolhida uma vez que é bastante comum sobretudo em zonas costeiras, porque com facilidade forma “blooms” e porque é uma espécie relativamente comum e com alguma robustez, não sendo extremamente sensível.



## **Material e Métodos:**

### **1. Condições de cultura:**

O trabalho foi desenvolvido utilizando *Chaetoceros* sp., da colecção de cultura do CCMMG (Centro do Clima, Meteorologia e Mudanças Globais), recolhida do Oceano Atlântico no Arquipélago dos Açores, mais especificamente de amostras de água do mar recolhidas a sensivelmente 4 milhas náuticas para Sul da marina de Angra do Heroísmo, 38°37'N 27°15'W.

No laboratório as culturas foram mantidas numa câmara incubadora onde eram controladas as condições de temperatura e luz. A incubadora com temperatura constante de 20°C e radiação de aproximadamente 350µmol quanta m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>, com um ciclo diário de 10/14 horas de luz/escuridão.

O meio de cultura da espécie foi em água do mar natural pré-filtrada e posteriormente enriquecida com nutrientes de acordo com f/2 modificado (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975). O meio f/2 modificado consiste em fazer alteração nas concentrações dos nutrientes adicionados, neste caso as concentrações finais são; 64µm de nitratos, 64µm de silicatos, 4.5µm de fosfatos. As vitaminas e metais vestigiais foram adicionados de acordo com a receita f/8 (Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975).

Previamente à experiência, o material que foi utilizado durante a mesma foi autoclavado para as culturas serem feitas em meio estéril, de forma a prevenir contaminações externas.

### **2. Desenho experimental:**

Nesta experiência estudou-se a taxa de crescimento do *Chaetoceros* sp. em diferentes concentrações teóricas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) dissolvido na água, nomeadamente a concentração existente actualmente no oceano que é cerca de 393ppm, uma concentração de um futuro com cerca de 750ppm e uma concentração de um futuro mais distante com cerca de 1500ppm, sendo estas concentrações teóricas as que se pretendem simular.

A água foi recolhida com a ajuda de um tubo de plástico maleável com 10m de comprimento e com lastro numa das pontas, para mantê-lo vertical e assim atingir a profundidade pretendida (10m), com o objectivo de ser recolhida uma amostra do

perfil vertical do mar. Após a recolha da água do mar, esta foi levada para o laboratório, colocada em meio estéril, e filtrada utilizando um filtro estéril Whatman Polycap Aqueos Solution Filter Capsule com 0.2  $\mu\text{m}$  de tamanho de poro com ajuda de uma bomba peristáltica de baixa pressão (Figura 3). A água foi toda filtrada de forma a serem retirados todos os seres vivos e esta ficar estéril. No total foram filtrados cerca de 25 litros (L) de água do mar, já contando com eventuais perdas na fase de transferência para as garrafas onde as culturas foram realizadas.



**Figura 3** – Processo de filtração da água em meio estéril.

O volume total da água foi então dividido por 3 garrações de 20L. Foram adicionados nutrientes e em 2 garrações foi também alterado o sistema de carbono para simular as condições de  $\text{CO}_2$  de um futuro próximo e de um futuro distante e de seguida dividiu-se a água de cada garração nas respectivas garrafas de pré-culturas e culturas. O sistema de carbono da água do mar foi manipulado quimicamente com adições combinadas de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e ácido clorídrico a condições de pH variável de acordo com Schulz *et al.*, (2010).

De forma a ter conhecimento de como cresce a espécie de fitoplâncton utilizada, foi feito um trabalho anterior a esta experiência para me habituar a trabalhar com os *Chaetoceros* sp. e daí foi determinada a taxa de crescimento média de forma a se poder fazer uma estimativa para as primeiras pré-culturas e depois a partir daí já tínhamos valores de taxa de crescimento, o número de divisões por dia e o tempo de cada geração.

As culturas foram mantidas com uma abundância baixa (durante a experiência as concentrações variaram entre 133 e 742 células/ml) para evitar alterações significativas no pH e no  $p\text{CO}_2$ .

As concentrações iniciais usadas foram 450ppm para o presente, não sendo alterado o sistema de carbono apenas nesta condição, de um futuro foi cerca de 925ppm e uma concentração real obtida de um futuro mais distante foi cerca de 1205ppm. Assim como, se pretende estudar o efeito da turbulência no desenvolvimento da espécie, e para isso colocaram-se as garrafas numa plataforma para que fossem mexidas exactamente de forma igual, ao mesmo tempo e o mesmo número de vezes.

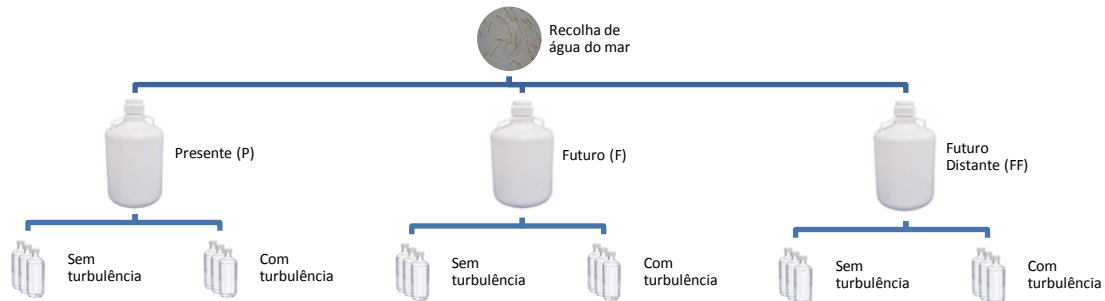
Fizeram-se 3 pré-culturas, com tempo de duração de cada pré-cultura variar consoante o número inicial de células, o número de gerações, a variação de pH e CO<sub>2</sub> das culturas e do volume de água do meio. O objectivo de fazer estas pré-culturas é para aclimatização e determinação da taxa de crescimento da espécie. A partir da última pré-cultura realizou-se experiência propriamente dita.

As culturas foram aclimatizadas às concentrações de CO<sub>2</sub> para um mínimo de 12 gerações e à turbulência por 10 gerações. Nos tratamentos com turbulência as células foram mexidas com maior frequência que nos outros meios. As culturas foram realizadas em triplicado em garrafas de polycarbonato de 1L e colocadas numa incubadora com temperatura constante de 20°C e radiação constante com aproximadamente 350μmol quanta m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. As culturas foram rodadas sobre o eixo mais longo 3 vezes ao dia exactamente à mesma hora e o mesmo número de vezes cada, no total foram 10 vezes. Nas culturas onde estava a ser aplicado o factor turbulência eram mexidas numa plataforma, no total de 15 vezes, idealizada e construída por mim (Figura 4a) para ser aplicado o factor turbulência nas pré-culturas e posteriormente foi construída uma de tamanho superior, pelo Francisco Reis (Figura 4b), para poder fazer o mesmo com as garrafas de 1L.



**Figura 4-** Plataformas planeadas e executadas por mim para ser aplicado o factor turbulência nas pré-culturas (a) e nas culturas (b), com respectiva escala.

No total foram analisados 18 replicados, conforme se pode ver no esquema a seguir ilustrado (Figura 5). As amostras foram recolhidas no início e no fim da experiência.



**Esquema 1-** Organograma elucidativo da organização de todo o desenho experimental.

### 3. Parâmetros analisados

#### 3.1. Sistema de Carbono

O sistema de carbono foi caracterizado com base em dois dos três parâmetros analisados (alcalinidade total, pH) e usando um software CO<sub>2</sub>SYS (Wallace *et al.*, 1998) calculou-se o valor de DIC (Carbono Inorgânico Dissolvido) usando as seguintes opções no software:

- Modo input;
- Conjunto de constantes: por Mehrbach *et al.*, (1973 adaptado por Dickson e Millero, 1987);
- $p\text{CO}_2$ ;
- KHSO<sub>4</sub> por Dickson;
- Escala de pH: Total Scale (mol/kg-SW).

#### 3.2. Alcalinidade Total

A alcalinidade total da água do mar é definida por Dickson *et al.* (1981), como “o número de moles do íão hidrogénio equivalentes ao excesso de protões aceitantes

sobre de potrões dados num kg de amostra”. A alcalinidade total é expressa em moles por kg de solução e é independente da temperatura.

Para a determinação da alcalinidade total foram filtrados 80ml com um filtro de seringa estéril Minisart 0.2µm para garrafas de polipropileno, armazenadas no escura a 4°C e medidas em menos de 48 horas para evitar que existisse mais actividade biológica. A análise realizou-se de acordo com Dickson *et al.* (2003) por titulação da amostra com 0.05N de ácido clorídrico (HCl) usando o sistema de titração Metrohm Tritino 848, o amostrador automático Methrom Compact Sample Changer 869. As amostras foram calibradas com material de referência fornecido por Dickson *et al.* (2007). Os cálculos foram efectuados com o software Matlab.

### 3.3. pH

O valor do pH representa a concentração do ião hidrogénio numa amostra de água do mar.

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$$

A concentração do ião hidrogénio é expressa em moles por kg de solução.

Existem dois métodos de medição do pH, aceites pela comunidade científica: a determinação potenciométrica e a determinação através do espectrofotómetro. Nesta experiência utilizaram-se ambos os métodos.

A determinação potenciométrica consiste na utilização de uma célula de eléctrodo (WTW 340i pH meter). Os milivolts do pH da amostra e os milivolts do pH de referência, Tris buffer (2-amino-2-hidroximetil-1,3propanodiol), foram medidos à mesma temperatura para evitar trocas com a atmosfera o valor do pH foi determinado imediatamente após a recolha. O pH também foi medido com um espectrofotómetro após adição do indicador *m*-cresol roxo. Foram filtrados 100 ml de amostra para uma garrafa de vidro com a ajuda de uma agulha colocada na seringa de forma a evitar a formação de bolhas. A amostra foi transferida para uma célula de circulação contínua com a ajuda de uma bomba (Cavro Pump XLP), a qual adicionou o corante indicador de pH (*m*-cresol roxo). Finalmente, o pH da amostra foi determinado usando o espectrofotómetro, Cary 50 da marca Varian com base na medição a absorvância a 3 comprimentos de onda diferentes, entre os 350 a 700nm.

### **3.4. Nutrientes (determinados de acordo com Koroleff and Hansen, (1999))**

Os nutrientes inorgânicos dissolvidos são essenciais para o crescimento do fitoplâncton. Para a determinação dos nutrientes de acordo com Koroleff and Hansen, (1999) foi filtrado 50ml de cada replicado com a ajuda de seringas e um filtro estéril Minisart 0.2µm.

#### **3.4.1. Fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ):**

A análise de  $\text{PO}_4^{3-}$  realizou-se adicionando 10ml de amostra à mistura de 0.3ml de Reagente I (4.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + molibdato de amônia + antimonil tartarato de potássio) e 0.3ml de ácido ascórbico. A determinação da concentração foi corrigida por calibração com três soluções padrão de 2; 4; 6µM, para além do branco. Depois de uma incubação durante 10 minutos á temperatura ambiente, mediu-se a absorvância no comprimento de onda de 882nm, usando a água bidestilada, como branco, utilizando um numa cuvete de 5cm utilizando o espectrofotómetro, Cary 50 da marca Varian.

#### **3.4.2. Nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ):**

A concentração de  $\text{NO}_2^-$  determinou-se com a adição de 10ml de amostra á mistura de 0.2ml de sulfonamida e 0.2ml de nafetiletlenodiamina. A determinação da concentração foi corrigida por calibração com três soluções padrão de 0,25; 0,5; 0,75µM, para além do branco. Depois de uma incubação durante 30 minutos á temperatura ambiente, mediu-se a absorvância no comprimento de onda de 542nm, usando a água bidestilada, como branco, utilizando um numa cuvete de 5cm utilizando o espectrofotómetro, Cary 50 da marca Varian.

#### **3.4.3. Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ):**

Para realizar a análise de  $\text{NO}_3^-$ , os compostos tiveram de ser reduzidos para  $\text{NO}_2^-$  com a ajuda de um reactor de cádmio adicionando os reagentes sulfanilamida e conjugando com o reagente N-(1-nafetil)-etilenodiamina dihidroclorato. A determinação da concentração foi corrigida por calibração com quatro soluções padrão de 20; 40; 60; 80µM, para além do branco. Depois de uma incubação durante

20 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorvância no comprimento de onda de 542nm, usando a água bidestilada, como branco, utilizando um numa cuvete de 5 centímetros utilizando o espectrofotômetro, Cary 50 da marca Varian. Às concentrações obtidas subtrai-se as concentrações do nitrito. Devido a um problema durante a medição das amostras, só se conseguiu obter a absorvância relativa entre amostras. Assim estimou-se a concentração final sabendo que a concentração inicial era de  $64\mu\text{mol L}^{-1}$ .

#### **3.4.4. Silicato ( $\text{Si(OH)}_4\text{-Si}$ ):**

A concentração de  $\text{Si(OH)}_4\text{-Si}$  determinou-se com a adição de 10ml de amostra a 0.3ml de mistura de reagentes I (ácido sulfúrico e solução de molibdato de amônia), esperou-se exactamente 10 minutos e adicionou-se 0.2ml de ácido oxálico (para suprimir qualquer interferência causada pela elevada concentração de  $\text{PO}_4^{3-}$ ) e imediatamente a seguir 0.2ml de ácido ascórbico. A determinação da concentração foi corrigida por calibração com quatro soluções padrão de 20; 40; 60;  $80\mu\text{M}$ , para além do branco. Depois de uma incubação durante 30 minutos á temperatura ambiente, mediu-se a absorvância no comprimento de onda de 810nm, usando a água bidestilada, como branco, utilizando um numa cuvete de 1cm utilizando o espectrofotômetro, Cary 50 da marca Varian.

### **3.5. Matéria Orgânica Particulada (POM)**

#### **3.5.1. Fósforo orgânico particulado (POP):**

Utilizando filtros Whatman GF/F (25mm,  $0.7\mu\text{m}$  de poro) que já tinham passado previamente por um processo de combustão de forma a eliminar toda a matéria orgânica ( $450^\circ\text{C}$ ; 5h), filtrou-se para o presente 80ml e para os outros meios 100ml de amostra a baixa pressão (200mbar) e posteriormente armazenou-se os filtros no congelador a  $-20^\circ\text{C}$ . Aquando da medição, depois de descongelarem, inseriu-se cada filtro numa garrafa de vidro Duran de 60ml, já com 40ml de água bidestilada, onde se adicionou também uma pequena colher de peroxidossulfato de potássio nos filtros. Estes foram colocados 30 minutos na panela de pressão o que faz converter o POP em ortofosfato e deixou-se arrefecer á temperatura ambiente. A análise do POP realizou-se adicionando à totalidade da amostra a mistura de 1.2ml de ácido ascórbico, agitou-se e aguardou-se 1 minuto. Imediatamente a seguir

adicionou-se 1.2ml de Reagente I (4.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + molibdato de amónia + antimonil tartarato de potássio). Depois de reagir e adquirir uma tonalidade azul transferiram-se 12ml de cada amostra para tubos de polipropileno e levou-se para a centrífuga. Esteve na centrífuga durante 10 minutos a alta velocidade. A determinação da concentração foi corrigida por calibração com três soluções padrão de 2, 4, 6µM, para além do branco. Mediu-se a absorvância no comprimento de onda de 882nm, usando a água bidestilada, como branco, utilizando um numa cuvete de 5cm utilizando o espectrofotómetro, Cary 50 da marca Varian.

### **3.5.2. Carbono orgânico particulado (POC) e azoto orgânico particulado (PON):**

De acordo com Sharp (1974) o POC e PON foram determinados com um analisador elementar acoplado a um cromatógrafo de gás, em que foi filtrado 150ml de amostra do presente e nos outros meios 200ml de amostra por um filtro Whatman GF/F (25mm) que já tinha passado previamente por um processo de combustão, de forma a eliminar toda a matéria orgânica (450°C; 5h). Para a determinação os filtros foram secos a 60°C durante aproximadamente 10h e depois envolvidos em copos de estanho (8x8x15mm) e medidos num cromatógrafo de gás. As amostras foram medidas e comparadas com valores padrão. Os valores de POC e PON foram determinados ao mesmo tempo e na mesma amostra.

As análises de carbono orgânico particulado e azoto orgânico particulado não foram efectuadas na Universidade dos Açores por ausência do equipamento necessário. Assim sendo, as amostras foram preparadas até estarem prontas a inserir no aparelho e enviadas para a Universidade de Southern Cross - Centre for Coastal Biogeochemistry Research na Austrália, pelo Kai Schulz com quem a Doutora Joana Barcelos e Ramos tem uma estreita colaboração.

Esta variação dos volumes filtrados para as análises visou colmatar pequenas alterações nas concentrações de células.

### **3.6. Contagem de células**

Contou-se o número de células no início e fim da experiência, para evitar que as concentrações de CO<sub>2</sub> se alterassem cada vez que as garrafas eram abertas para retirar uma amostra para contagem. Para além de que, cada vez que se retira um



pequeno volume da garrafa iria aumentar a quantidade de ar existente no topo da mesma e era o suficiente para alterar a concentração de CO<sub>2</sub>.

Para a contagem, foi retirada uma amostra de cada meio e foi efectuada uma diluição para a contagem desta, uma vez que a concentração celular era muito elevada. De seguida transferiu-se algum do volume do balão volumétrico para uma câmara de contagem de Utermöhl e deixou-se repousar a amostra para sedimentação. A abundância de células é determinada usando técnicas de sedimentação, de acordo com Utermöhl (1958). As amostras de culturas foram coradas e fixas com solução de Lugol (~2%).

A contagem fez-se num microscópio invertido, Nikon eclipse TS100, com uma ampliação de 100x e em cada câmara foi contada a totalidade das células existentes. De forma aos resultados serem aceites para tratamento estatístico foram contadas pelo menos 300 células por câmara.

A taxa de crescimento de uma espécie é uma média específica e é determinada de acordo com Lavasseur et al. 1993:

$$\mu = (\ln(C_f) - \ln(C_i)) / (t_2 - t_1)$$

Onde C<sub>f</sub> é a concentração final expresso em células/ml no dia t<sub>2</sub> e a C<sub>i</sub> é a concentração inicial expresso em células/ml no dia t<sub>1</sub>.

O número de divisões diárias pode ser calculado a partir da taxa de crescimento ( $\mu$ ), e é dado por:

$$\text{Divisões diárias: } \text{Div. dia}^{-1} = \mu / \ln 2$$

## Resultados:

### 1. Sistema de Carbono:

Na tabela I estão os resultados obtidos de todos parâmetros estudados no sistema de carbono. Os valores estimados para as concentrações de CO<sub>2</sub> eram 380, 750 e 1500ppm para os tratamentos que simulam o presente (P), futuro (F), futuro distante (FF), respectivamente. Na realidade a concentração obtida foi para os meios P, F e FF respectivamente de 450, 925 e 1205ppm e onde o valor médio final das amostras foi de 482, 854 e 1092ppm.

**Tabela I** - Resultados iniciais e finais do Sistema de Carbono. Nesta tabela estão presentes os valores para a pressão parcial de CO<sub>2</sub> ( $p\text{CO}_2$ ) (todos os valores com um asterisco (\*) à frente são valores médios), os valores de pH obtidas a partir da determinação potenciométrica com a utilização do eléctrodo (pH), a concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), carbono inorgânico dissolvido (DIC) e a alcalinidade total (TA).

		Amostras	$p\text{CO}_2$	pH	CO <sub>2</sub>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	DIC	TA
		Unidades	$\mu\text{atm}$		$\mu\text{mol kg}^{-1}$	$\mu\text{mol kg}^{-1}$	$\mu\text{mol kg}^{-1}$	$\mu\text{mol kg}^{-1}$	$\mu\text{mol kg}^{-1}$
Início	P	P	452,30	7,999	14,53	1877,16	172,82	2064,51	2310,28
	F	F	924,85	7,711	29,71	1979,86	94,02	2103,59	2223,09
	FF	FF	1204,81	7,560	43,04	2026,32	67,98	2137,34	2204,44
Fim	P	1P	435,41*	8,028	13,45	1857,09	182,78	2053,31	2315,81
		2P	490,66*	7,941	16,99	1925,36	155,44	2097,79	2315,81
		3P	489,44*	7,943	16,92	1924,11	155,95	2096,99	2315,81
		4PT	495,55*	7,935	17,31	1930,27	153,40	2100,98	2315,81
		5PT	487,03*	7,947	16,76	1921,58	156,98	2095,33	2315,81
		6PT	495,59*	7,935	17,31	1930,51	153,41	2101,24	2315,81
	F	7F	891,34*	7,758	27,56	2047,70	108,43	2183,69	2324,39
		9F	841,79*	7,806	24,37	2023,48	119,71	2167,57	2328,18
		10F	829,35*	7,818	23,57	2012,09	122,38	2158,05	2323,81
		8FT	840,96*	7,804	24,32	2009,55	118,33	2152,20	2310,60
		11FT	835,24*	7,810	23,95	2006,98	119,83	2150,77	2311,67
		12FT	886,53*	7,761	27,25	2036,14	108,43	2171,81	2310,99
	FF	13FF	1146,29*	7,663	34,94	2086,41	88,78	2210,13	2312,93
		14FF	906,24*	7,889	19,52	1960,35	140,29	2120,16	2315,55
		15FF	1127,62*	7,677	33,74	2079,76	91,34	2204,85	2312,06
		16FFT	1125,11*	7,679	33,58	2079,44	91,76	2204,78	2313,22
		17FFT	1130,35*	7,675	33,92	2080,10	90,90	2204,92	2313,61
		18FFT	1118,72*	7,684	33,17	2076,26	92,61	2202,04	2312,64

Verifica-se que o pH dos meios iniciais era de 8.00; 7.71 e 7.56 respectivamente para os meios do P, F e FF, dando os valores que era suposto uma vez que quando a concentração média de CO<sub>2</sub> aumenta o valor do pH baixou, sendo inversamente proporcionais. No final da experiência os valores finais médios para cada meio era respectivamente de 7.95; 7.79 e 7.71, e comparando entre eles, verifica-se que aumenta a concentração de CO<sub>2</sub> e vai baixando gradualmente o valor do pH.

A concentração de CO<sub>2</sub> existente na água em  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  inicialmente para os meios do P, F e FF era de 14.53, 29.71 e 43.04  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  e no final da experiência os valores médios para cada meio era respectivamente de 16.46, 25.17 e 31.48  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ . Verificou-se um decréscimo da concentração do CO<sub>2</sub> para os meios do F e FF, comparando com o valor inicial.

Para o bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) a concentração existente na água inicial, em  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , era para os meios P, F e FF de 1877.16; 1979.86 e 2026.32  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  e no final da experiência os valores médios para cada meio era respectivamente de 1914.82; 2009.55 e de 2079.44  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ . Verificou-se um aumento da concentração do HCO<sub>3</sub> para todos os meios assim como aconteceu com o valor inicial.

A concentração de carbonato (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) existente na água em  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  inicialmente para os meios do P, F e FF era de 172.82; 94.02 e 67.98  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  e no final da experiência os valores médios para cada meio era respectivamente de 159.66; 119.83 e 99.28  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ . Comparando os valores finais da concentração existe uma diminuição onde a concentração final mais elevada corresponde ao P e a mais baixa corresponde ao FF, assim como acontece nos valores iniciais de concentração. Em relação aos valores iniciais e finais, comparando, no P decresce a concentração enquanto nos meios do F e FF existe um aumento nas concentrações.

O carbono inorgânico dissolvido (DIC) a concentração existente na água inicial, em  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , era para os meios P, F e FF de 1877.16; 1979.86 e 2026.32  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  e no final da experiência os valores médios para cada meio era respectivamente de 1914.82; 2009.55 e de 2079.44  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ . Verificou-se um aumento da concentração do DIC para todos os meios assim como aconteceu com o valor inicial.

Finalmente na alcalinidade total (TA) a concentração existente inicialmente na água, em  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ , era para os meios P, F e FF de 2310.28; 2223.09 e 2204.44  $\mu\text{mol kg}^{-1}$  e no final da experiência os valores médios para cada meio era

respectivamente de 2315.81; 2318.27 e de 2313.04  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ . Verificou-se um aumento da concentração para todos os meios do P e F e no meio do FF verificou-se um decréscimo na concentração comparando com os restantes valores finais, no geral comparando com o valor inicial verificou-se um aumento das concentrações da TA.

Comparando todos os dados do sistema de carbono pode verificar-se que à medida que o  $p\text{CO}_2$  vai aumentando os valores do pH,  $\text{CO}_3^{2-}$  e TA vão diminuindo e os valores das concentrações do  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e DIC vão aumentando. Relativamente à turbulência as únicas amostras onde se nota uma maior diferença, entre os valores no final da experiência, no sistema de carbono é na alcalinidade total no meio do futuro. Nas restantes amostras não se notam alterações significativas entre si onde foi aplicado o factor turbulência e onde não se aplicou o factor turbulência.

O tratamento em que a concentração do  $\text{CO}_2$  representa o presente tem uma alcalinidade total no início da experiência diferente do tratamento com concentrações similares ao futuro e futuro distante porque a água é diferente. Uma vez que foi impossível a experiência ser toda feita ao mesmo tempo o P e os meios F e FF foram feitos em alturas diferentes e com diferentes recolhas de água.

## 2. Nutrientes:

A análise da Tabela II revela que a adição de nutrientes foi um pouco acima da esperada (64  $\mu\text{m}$  de nitratos, 64  $\mu\text{m}$  de silicatos, 4.5  $\mu\text{m}$  de fosfatos) com excepção da concentração de fosfato inicial a concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o presente (450  $\mu\text{atm}$ ). Analisando a diferença entre as concentrações finais e iniciais de cada replicado, verifica-se que o máximo consumo pelas culturas de *Chaetoceros* sp. ocorreu a concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro distante (1205  $\mu\text{atm}$ ) e o mínimo a concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro (925  $\mu\text{atm}$ ). Na Tabela II estão apresentados os valores das análises aos nutrientes existentes na água no início da experiência onde ainda não existia actividade biológica e no final da experiência.

De salientar que os dados para os nitratos são estimativas uma vez que durante a leitura das amostras houve uma falha de luz e o espectrofotómetro e respectivo computador, desligaram-se.

Nos nutrientes analisados os silicatos foram os únicos onde foi possível efectuar as análises a todas as amostras finais dos 3 meios simulados. Como explicado anteriormente esta falta de dados deve-se ao problema que tive com a

avaria do espectrofotómetro existente no laboratório onde trabalhei e á inexistência de mais algum disponível que pudesse levar uma cuvete de 5cm para as leituras serem feitas conforme os procedimentos do protocolo de onde me estava a guiar. Uma vez que para os silicatos as amostras são as únicas a ser lidas numa cuvete de 1cm já foi possível ler as amostras noutra laboratório que gentilmente me possibilitou a utilização do seu espectrofotómetro.

Como se pode verificar nos silicatos, comparando o meio inicial com o final, no meio onde concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o presente, existem duas amostras em que o valor é superior ao inicial, no meio onde concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro apenas uma amostra tem o valor inferior ao inicial, e em relação ao meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante apenas uma amostra tem o valor superior ao inicial. A concentração inicial dos fosfatos, em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , nos meios onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o presente, o futuro e o futuro distante foi respectivamente de 52.68; 76.98 e 84.20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração final verifica-se que 2 amostras do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o presente, 5 amostras do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro e 1 amostra do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante, têm uma concentração superior à inicial. A média final das concentrações é respectivamente de 50.30; 90.15 e 82.94 $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Comparando as concentrações iniciais e finais médias das amostras verifica-se que apenas houve um aumento da concentração final no meio do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro e dos meios do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o presente e o futuro distante diminuíram as concentrações.

Nas amostras dos nitratos conforme referido anteriormente os valores são estimados, devendo-se este facto mais uma vez, a um problema com um espectrofotómetro que se desligou a meio de uma leitura devido a uma falha da luz. Para além deste pequeno contratempo também não existem dados das concentrações finais para o presente pelo motivo acima referido.

Para os nitratos, comparando com a concentração inicial existente, no meio onde concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro, existem 3 valores inferiores ao inicial e no meio onde concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante, todos os valores também são inferiores ao inicial.

A concentração inicial dos nitratos, em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , nos meios onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o presente, o futuro e o futuro distante foi

respectivamente de 71.65; 68.38 e 70.66  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração final verifica-se que 1 amostra do meio onde concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro tem uma concentração superior à inicial. A média final das concentrações para os meios onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e o futuro distante é de 67.71 e 67.72  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Comparando as concentrações iniciais e finais médias das amostras dos meios onde a concentração de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e o futuro distante verifica-se que houve uma diminuição da concentração nos meios.

Inicialmente a concentração dos nitritos, em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , nos meios onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o presente, o futuro e o futuro distante era respectivamente de 0.10, 0.07 e 0.05  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração final verifica-se que 5 amostras do meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e 3 amostras do meio onde a concentração de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e o futuro distante têm uma concentração superior à inicial. A média final das concentrações dos meios onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e futuro distante são de 0.09 e 0.06  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Comparando as concentrações iniciais e finais médias das amostras do meio onde a concentração de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e futuro distante verifica-se que houve um aumento da concentração nos meios. Não existem dados das concentrações finais para o presente pelo motivo acima referido.

A concentração inicial dos fosfatos, em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , nos meios onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o presente, o futuro e o futuro distante foi respectivamente de 3.65, 7.53 e 7.55  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A concentração final não se verificam amostras com uma concentração superior à inicial. A média final das concentrações para os meios onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e futuro distante são de 6.46 e 6.05  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Comparando as concentrações iniciais e finais médias das amostras do meio onde a concentração de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e futuro distante verifica-se que houve uma diminuição da concentração nos meios.

No geral, na maioria das amostras verifica-se a diminuição da concentração inicial dos nutrientes o que significa que foi utilizado pelos *Chaetoceros* sp. para o seu desenvolvimento. Mais ainda se verifica que algumas amostras têm valores finais superiores aos iniciais o que não era suposto. Uma vez que se multiplicaram células no meio e tendo em conta que como são seres autotróficos utilizam os nutrientes existentes na água para o seu desenvolvimento para além da energia retirada da luz, era de assumir que existiria diminuição da concentração inicial dos nutrientes.

Não existem diferenças significativas entre as amostras onde foi aplicada a turbulência e onde não foi aplicada a turbulência

**Tabela II** - Valores iniciais e finais dos nutrientes analisados.

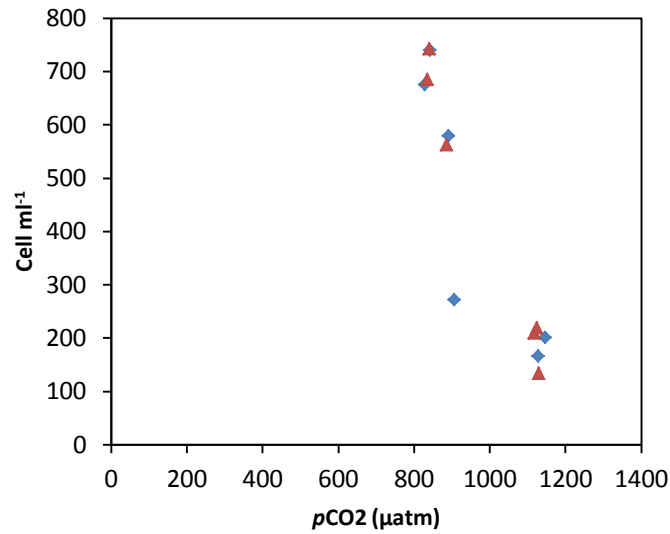
		Amostras	Silicatos	Nitratos	Nitritos	Fosfato	
		Unidades	[ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	[ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]	
Início	P	P	52,68	71,65	0,10	3,65	
	F	F	76,98	68,38	0,07	7,53	
	FF	FF	84,20	70,66	0,05	7,55	
Fim	P	1P	52,71	-	-	-	
		2P	50,03	-	-	-	
		3P	48,75	-	-	-	
		4Pt	56,24	-	-	-	
		5Pt	47,57	-	-	-	
		6Pt	46,50	-	-	-	
	F	7F	96,63	67,92	0,09	6,89	
		9F	97,23	68,36	0,10	6,82	
		10F	97,97	67,77	0,10	7,01	
		8Ft	89,98	66,89	0,09	6,36	
		11Ft	87,62	68,55	0,11	6,31	
		12Ft	71,49	66,79	0,07	5,35	
	FF	13FF	79,95	67,37	0,05	5,88	
		14FF	81,53	67,06	0,06	6,00	
		15FF	75,02	66,58	0,05	5,34	
			16FFt	79,60	69,23	0,07	5,73
			17FFt	100,07	68,92	0,07	7,19
			18FFt	81,49	67,17	0,04	6,14

Para o presente a inexistência de dados deve-se a uma avaria no espectrofotómetro o que impossibilitou a leitura de parte das amostras. Como não havia mais nenhum no edifício onde fosse possível adaptar a cuvete de 5cm, as amostras foram eliminadas, uma vez que, passado algum tempo depois de se adicionarem os reagentes elas começam a deteriorar-se e os valores lidos já não são os reais. Apenas existem dados para os silicatos porque no edifício existia um laboratório com um espectrofotómetro livre e que possibilitou a leitura.

### 3. Biomassa:

Na Figura 6 pode-se verificar o número de células existente por ml de cada amostra. Neste gráfico não existem valores para o P uma vez que não foi possível

contar células suficientes para validar as amostras. Esta incongruência nas contagens deve-se, provavelmente, a um problema durante a recolha das amostras.



**Figura 6** – Abundância de células em relação à concentração média de CO<sub>2</sub> a que as células estiveram expostas no decurso da experiência. As amostras em que não foi aplicado o factor turbulência que estão sempre representadas com um losango azul e as amostras com turbulência com o triângulo vermelho.

É possível verificar que existe um maior número de células nas amostras onde o pCO<sub>2</sub> é cerca de 900µatm, à excepção de um replicado (~ 270células ml<sup>-1</sup>) em que o pCO<sub>2</sub> se alterou bastante no decorrer da experiência e ficou muito mais baixo do que era suposto. Mas como as células estavam habituadas a uma concentração média de CO<sub>2</sub> superior, habituaram-se perfeitamente e continuaram a dividir-se.

A concentração de células inicial nas amostras foi de 5células por ml. No meio do F o valor mais baixo de células por ml contadas foi de 562células e o mais elevado foi de 740células por ml. No meio do FF o valor mais baixo de células por ml contadas foi de 133células por ml e o mais elevado foi de 271células por ml. A concentração média final foi para o meio do F e FF de 644 e 199células por ml. Esta diferença de número de células deve-se ao facto de as culturas do meio F e do FF terem uma duração diferente, respectivamente de 4 e 3 dias, tendo sido suficiente para esta diferença de número de células por ml. Esta diferença de dias aconteceu porque quando fui observar as culturas, no dia em que estava a acabar a experiência, verifiquei a olho (sem qualquer tipo de contagem) que existia menos células no meio



F e daí a decisão de deixar a cultura mais um dia, garantindo assim um bom número de células.

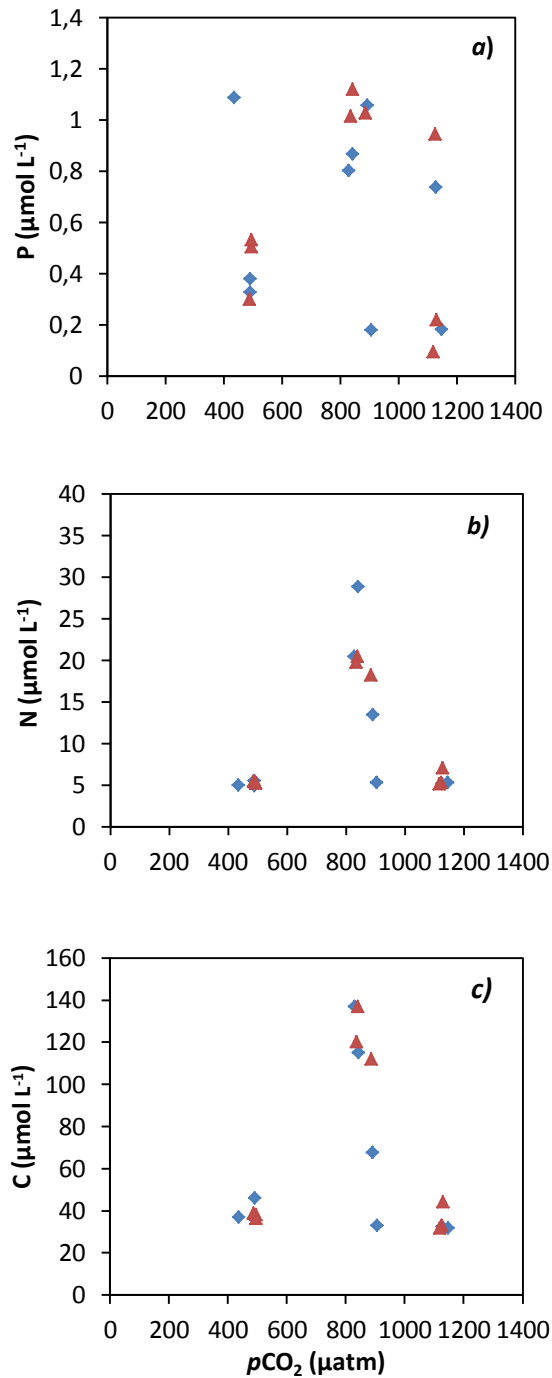
Não se verificaram alterações significativas no número de células por ml entre as amostras onde não foi e foi aplicado o factor turbulência.

#### **4. Matéria Orgânica Particulada:**

As concentrações de fósforo particulado (P) variam entre 0.095 e 1.119  $\mu\text{mol L}^{-1}$  correspondendo estes valores a amostras do meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e o futuro distante respectivamente, tendo uma diferença máxima entre replicados de 1.024  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 7a). O valor médio de todos os replicados para as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o presente, futuro e futuro distante de 0.522, 0.982 e 0.393  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. A variação entre os replicados é superior a potenciais diferenças, devido a dois pontos, um no presente e outro no futuro.

As concentrações de azoto particulado (N) variam entre 28.87 e 4.93  $\mu\text{mol L}^{-1}$  correspondendo estes valores a amostras do meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e o presente, respectivamente, tendo uma diferença máxima entre replicados de 23.94  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 7b). O valor médio de todos os replicados para as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o presente, futuro e futuro distante de 5.24, 20.22 e 5.54  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. A variação entre os replicados é superior a potenciais diferenças, devido a três pontos, dois do futuro e um do futuro distante.

As concentrações de carbono particulado (C) as concentrações variam entre 136.75 e 31.67  $\mu\text{mol L}^{-1}$  correspondendo estes valores a amostras do meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e o futuro distante respectivamente, tendo uma diferença máxima entre replicados de 105.08  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 7c). O valor médio de todos os replicados para as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o presente, futuro e futuro distante é de 38.78, 114.68 e 34.28  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. A variação entre os replicados é superior a potenciais diferenças, devido a dois pontos, uma do futuro e um do futuro distante.



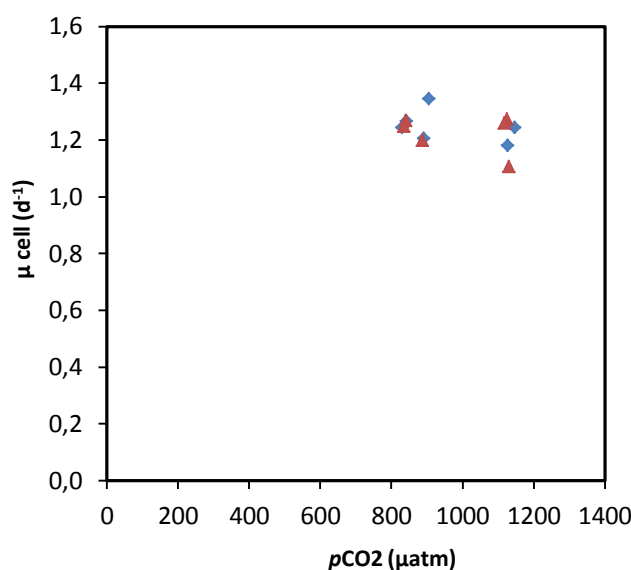
**Figura 7** - Concentração dos nutrientes, a) fósforo (P), b) azoto (N) e c) o carbono (C) em relação ao aumento das concentrações de CO<sub>2</sub>. As amostras em que não foi aplicado o factor turbulência que estão sempre representadas com losangos azuis e as amostras com turbulência com triângulos vermelhos.

No geral verifica-se que as amostras onde foi aplicado o factor turbulência têm valores mais próximos no C e N. Para o P, principalmente nos meios onde as

concentrações de CO<sub>2</sub> são mais elevadas isso não está visível, uma vez que as concentrações das amostras têm uma grande variação entre si.

## 5. Crescimento

Os valores da taxa de crescimento celular ( $\mu$ ) diário para diferentes  $p\text{CO}_2$  não variaram significativamente com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> (entre 1.11 e 1.34) e níveis de turbulência (Figura 3). Uma vez que não foi possível contar as células, como referido anteriormente no presente, apenas estão referidos os dados do futuro e futuro distante.



**Figura 3** - Crescimento do número de células diário a diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>. As amostras em que não foi aplicado o factor turbulência que estão sempre representadas com um losango azul e as amostras com turbulência com o triângulo vermelho.

Verifica-se um crescimento do número de células semelhante para as duas condições de  $p\text{CO}_2$ , que variam entre 1,11 e 1,34 divisões por dia. Estes dados são semelhantes apesar de o número de dias de incubação ser distinto, nomeadamente, 4 dias para o meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simula o futuro e para o meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simula o futuro distante 3 dias.

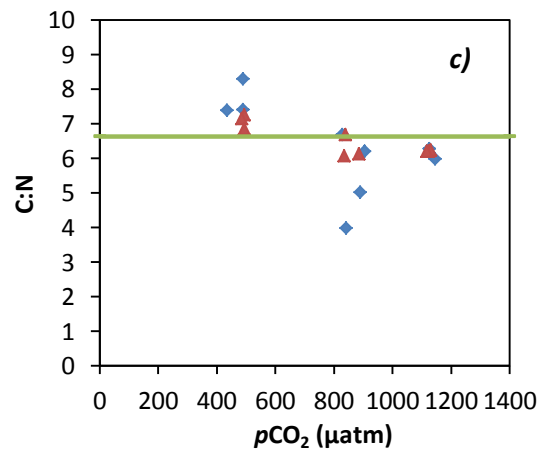
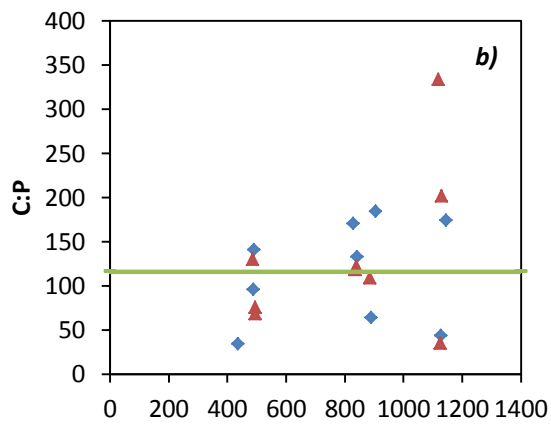
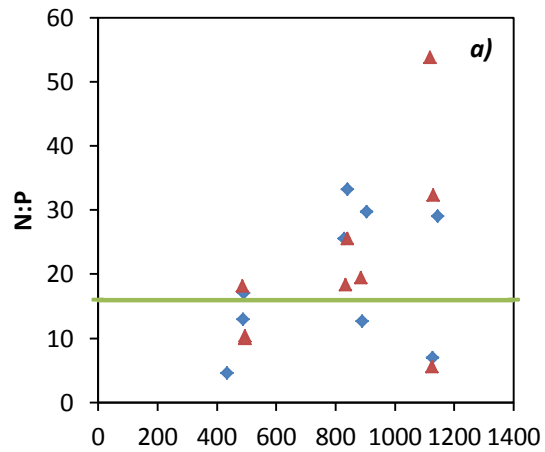
Não se verificaram alterações significativas no de crescimento celular diário entre as amostras onde não foi e foi aplicado o factor turbulência.

## 6. Ratio dos elementos da matéria orgânica particulada

Depois da contagem celular e de determinar a respectiva taxa de crescimento celular determinou-se o ratio entre cada elemento na matéria orgânica particulada analisado e os valores descritos por Redfield *et al* (1963), que diz que a razão entre o C:N:P é respectivamente de 106:16:1. Como tal, na figura 4 estão os gráficos onde são apresentados os ratios com os dados da experiência e para comparar com o ratio de Redfield em cada gráfico foi traçada uma linha com o valor conhecido de cada razão entre os nutrientes.

O ratio N:P as concentrações das amostras variam entre 4.59 e 53.79  $\mu\text{mol L}^{-1}$  correspondendo estes valores a amostras do meio P e do meio do FF respectivamente (Figura 8a). O valor médio final para as amostras do meio do P, F e do FF são exactamente 12.18, 21.16 e 26.25  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Apesar dos valores das concentrações não mostrarem estar muito agrupados, a maioria das amostras encontra-se acima da recta que está a indicar o ratio de Redfield. Graficamente não se verificavam resultados significantes, à vista, entre as amostras onde foi aplicado o factor turbulência e onde não foi aplicado este factor. Então aplicou-se o teste estatístico, ANOVA, com os dados das amostras de com e sem turbulência juntos. Para um intervalo de confiança a 95%;  $p=0,534$ . Normalmente para estudos com o fitoplâncton assume-se que para 95% de confiança ( $p=0,05$  ou menor), logo assume-se que não é significativa.

O ratio C:P as concentrações das amostras variam entre 34 e 333.35  $\mu\text{mol L}^{-1}$  correspondendo estes valores a amostras do meio P e do meio do FF respectivamente (Figura 8b). O valor médio final para as amostras do meio do P, F e do FF são exactamente 90.74, 119.31 e 161.94  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Apesar dos valores das concentrações não se mostrarem estar muito agrupados, em especial nas amostras onde a concentração de  $\text{CO}_2$  é maior, a maioria das amostras encontra-se acima da recta indicativa do ratio de Redfield. Graficamente não se verificavam resultados significantes, à vista, entre as amostras onde foi aplicado o factor turbulência e onde não foi aplicado este factor. Então aplicou-se o teste estatístico, ANOVA, com os dados das amostras com e sem turbulência juntos. Para um intervalo de confiança a 95%;  $p=0,391$ . Normalmente para estudos com o fitoplâncton assume-se que para 95% de confiança ( $p=0,05$  ou menor), logo assume-se que não é significativa.



**Figura 8** - Os ratios com os dados da experiência, N:P (a), C:P (b), C:N (c) e para comparar com o ratio de Redfield em cada gráfico foi traçada uma linha com o valor conhecido de cada razão entre os elementos. As amostras em que não foi aplicado o factor turbulência estão representadas com um losango azul e as amostras com turbulência com o triângulo vermelho.

O ratio C:N as concentrações das amostras variam entre 3.99 e 8.29  $\mu\text{mol L}^{-1}$  correspondendo estes valores a amostras do meio F e do meio do P respectivamente (Figura 8c). O valor médio final para as amostras do meio do P, F e do FF são exactamente 7.39, 5.76 e 6.18  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . No geral, os valores das concentrações estão bastante agrupados em especial nas amostras onde a concentração de  $\text{CO}_2$  é menor, à excepção de três amostras, as outras concentrações estão bem agrupadas. A maioria das amostras encontra-se abaixo da recta que está a indicar o ratio de Redfield.

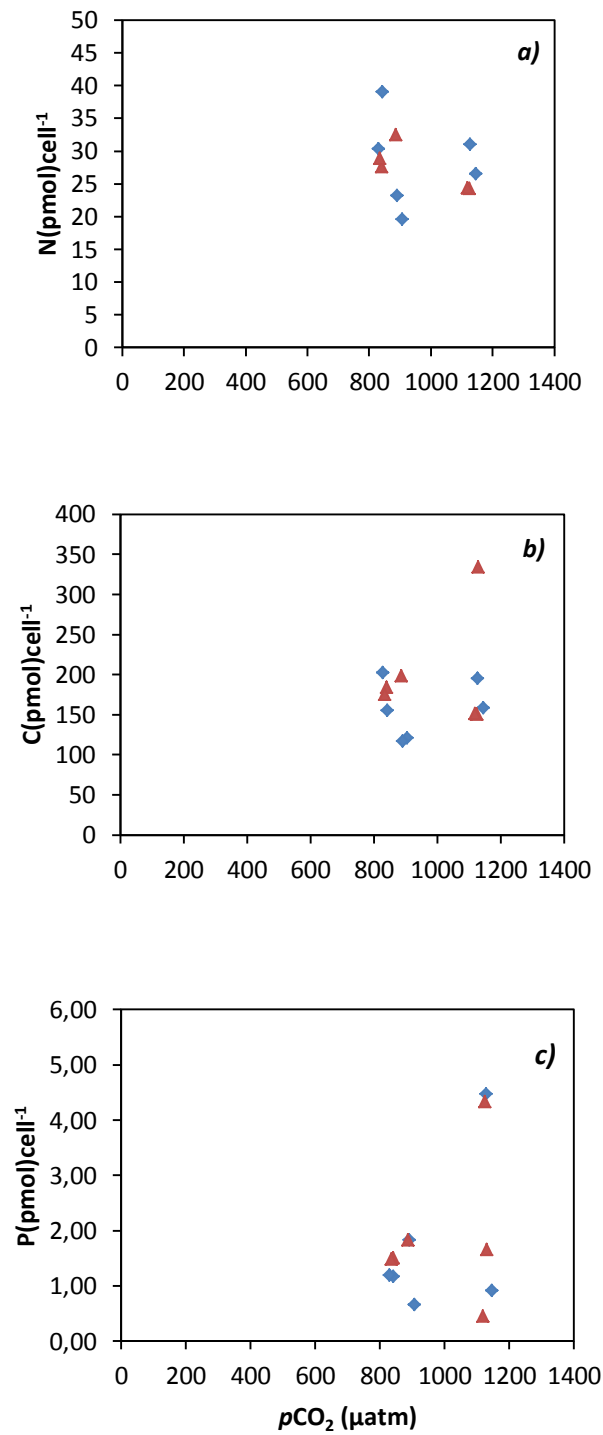
Verifica-se também que as amostras onde foi aplicado o factor turbulência têm valores de concentrações mais próximos, estando assim mais agrupados. Graficamente não se verificavam resultados significantes, à vista, entre as amostras onde foi aplicado o factor turbulência e onde não foi aplicado este factor. Então aplicou-se o teste estatístico, ANOVA, com os dados das amostras de com e sem turbulência juntos. Para um intervalo de confiança a 95%;  $p=0,0022$ . Normalmente para estudos com o fitoplâncton assume-se que para 95% de confiança ( $p=0,05$  ou menor), logo assume-se que é significativa.

## 7. Conteúdos celulares

Para finalizar as análises realizadas só falta estimar os conteúdos (C, P, N) existentes. Os nutrientes na célula podem estar em qualquer parte da sua constituição, visto que se analisa o todo.

À excepção de apenas uma a duas amostras para cada nutriente os pontos estão relativamente próximos e a diferença entre o valor maior e menor para cada um deles não é muito diferente (Figura 9).

Devido ao problema referido anteriormente com as amostras das concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o presente, como não foi possível efectuar a contagem celular, também não foi possível calcular a quantidade de cada nutriente existente por célula.



**Figura 9** - Quantidade de nutrientes inorgânicos a) azoto, b) carbono, c) fósforo, existentes por célula nos meios onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro e o futuro distante. As amostras em que não foi aplicado o factor turbulência estão representadas com um losango azul e as amostras com turbulência com o triângulo vermelho.

A quantidade de N presente por célula varia entre 19.59 e 53.52pmol cell<sup>-1</sup> correspondendo estes valores a amostras do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante (Figura 9a). O valor médio final para as amostras dos meios onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro e o futuro distante são exactamente 30.26 e 29.91pmol cell<sup>-1</sup>. No geral, os valores das concentrações estão agrupados, à excepção de uma amostra correspondente ao meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante. Graficamente não se verificavam resultados significantes, à vista, entre as amostras onde foi aplicado o factor turbulência e onde não foi aplicado este factor. Então aplicou-se o teste estatístico, ANOVA, com os dados das amostras de com e sem turbulência juntos. Para um intervalo de confiança a 95%; p=0,95. Normalmente para estudos com o fitoplâncton assume-se que para 95% de confiança (p=0,05 ou menor), logo assume-se que não é significativa.

A quantidade de P presente por célula varia entre 0.45 e 4.47pmol cell<sup>-1</sup> correspondendo estes valores a amostras do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante (Figura 9c). O valor médio final para as amostras do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro e o futuro distante são exactamente 1.50 e 2.08pmol cell<sup>-1</sup>. No geral, os valores das concentrações estão agrupados, à excepção de duas amostras correspondente ao meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante. Graficamente não se verificavam resultados significantes, à vista, entre as amostras onde foi aplicado o factor turbulência e onde não foi aplicado este factor. Então aplicou-se o teste estatístico, ANOVA, com os dados das amostras de com e sem turbulência juntos. Para um intervalo de confiança a 95%; p=0,467. Normalmente para estudos com o fitoplâncton assume-se que para 95% de confiança (p=0,05 ou menor). Logo assume-se que não é significativa.

A quantidade de C presente por célula varia entre 116.88 e 333.97pmol cell<sup>-1</sup> correspondendo estes valores a amostras do meios onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro e o futuro distante (Figura 9b). O valor médio final para as amostras do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro e o futuro distante são exactamente 172.28 e 185.22pmol cell<sup>-1</sup>. No geral, os valores das concentrações estão agrupados, à excepção de uma amostra correspondente ao meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante. Graficamente não se verificavam resultados significantes, à vista, entre as amostras onde foi aplicado o



factor turbulência e onde não foi aplicado este factor. Então aplicou-se o teste estatístico, ANOVA, com os dados das amostras de com e sem turbulência juntos. Para um intervalo de confiança a 95%;  $p = 0,71$ . Normalmente para estudos com o fitoplâncton assume-se que para 95% de confiança ( $p=0,05$  ou menor). Logo assume-se que não é significativa.

Verifica-se que no meio onde a concentração de  $\text{CO}_2$  é mais elevada é onde se encontram os valores onde se encontra o mínimo e máximo de nutrientes por células, salvo uma exceção. Para o meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro distante, verifica-se que as células contêm em média mais C e P que no meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro. Já no meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro as células contêm em média mais N que no meio onde as concentrações de  $\text{CO}_2$  que simulam o futuro distante. Assim como se notou nos gráficos acima onde estão expressos os ratios entre nutrientes, nestes gráficos também é possível verificar que os pontos em que estão representadas as amostras com turbulência estão no geral muito mais agrupados. Verifica-se também que não existe uma grande diferença entre os valores para as duas concentrações de  $\text{CO}_2$ .

## Discussão:

### **1. Efeito do aumento da concentração do CO<sub>2</sub> no *Chaetoceros* sp..**

A maioria dos estudos que investigam o efeito do CO<sub>2</sub> no crescimento do fitoplâncton, e é difícil distinguir se a resposta se deve ao aumento da concentração de CO<sub>2</sub> ou ao pH, uma vez que estão interligados entre eles. Há medida que a concentração de CO<sub>2</sub> aumenta o pH desce. O aumento da concentração do CO<sub>2</sub> e consequente decréscimo do pH afecta o fitoplâncton marinho de variadas formas. De facto, estudos anteriores mediram um decréscimo na calcificação pelos coccolitóforos uma vez que estes possuem uma sensibilidade notável (Rost *et al.*, 2008). Espécies como a *Emiliania huxleyi* expostas a concentrações de CO<sub>2</sub> elevadas demonstram, frequentemente, um aumento da fotossíntese (Paasche 1964; Nielsen 1995; Riebesell *et al.*, 2000). Em relação às diatomáceas, esse importante grupo do fitoplâncton, existem muito poucos estudos foca nos potenciais efeitos da acidificação do oceano. Estudos anteriores sugerem que as diatomáceas de maiores dimensões, estão limitadas pelo fornecimento de CO<sub>2</sub> no oceano contemporâneo (Riebesell *et al.*, 1993). Mais tarde, descobriu-se que muitas diatomáceas, especialmente as que têm tendência a formar blooms, tinham a capacidade de compensar fornecimento baixo de CO<sub>2</sub> através do uso de um altamente regulado e eficiente mecanismo de concentração de CO<sub>2</sub> (Burkhardt *et al.*, 2001; Rost *et al.*, 2003). Relativamente ao processo de produção de sílica, aparentemente este processo não é particularmente sensível ao aumento da concentração do CO<sub>2</sub>. Contudo, estudos efectuados no campo, demonstram que diferentes níveis de CO<sub>2</sub> causam mudanças nas diatomáceas dominantes (Tortell *et al.*, 2002), assim como estudos mais recentes demonstram que concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> levam a um aumento na produtividade do fitoplâncton e promove o crescimento de grandes formações/cadeias de diatomáceas (Rost *et al.*, 2008). Enquanto o efeito do aumento de CO<sub>2</sub> no crescimento das diatomáceas não parecer ser tão forte, como noutros taxa, as previsões de alterações na estratificação e consequentemente na luz e disponibilidade de nutrientes, pode afectar este grupo (Rost *et al.* 2008).

O efeito observado aqui no *Chaetoceros* sp. nos tratamentos que simulam concentrações de CO<sub>2</sub> do futuro e o futuro distante não é muito visível (crescimento do número de células semelhante nas duas condições de pCO<sub>2</sub>, entre 1,11 e 1,34 células por dia). Apesar das diferentes nas concentrações de CO<sub>2</sub> nos meios os

*Chaetoceros* sp. continuaram a desenvolver-se perfeitamente. Verificou-se a presença de células com um tamanho muito superior às restantes amostras em todas as culturas do meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante comprovando o que foi dito acima retirado do estudo de Rost *et al.* (2008), acerca da tendência para as células em concentrações de CO<sub>2</sub> poderem promover o crescimento de grandes formações/cadeias de diatomáceas. Como tal, mantêm-se a opinião de que as diatomáceas são menos sensíveis ao aumento de CO<sub>2</sub> relativamente a outras espécies como os cocolitóforos (Barcelos e Ramos *et al.*, 2014).

Estudos recentes com a *Asterionellopsis glacialis* demonstram que tem como resposta ao aumento de CO<sub>2</sub> o aumento do comprimento das cadeias assim como a proximidade entre células poderá ser uma estratégia para aumentar o pH no centro da colónia durante o dia ou simplesmente uma consequência da natureza das ligações estabelecidas entre as células na cadeia (Barcelos e Ramos *et al.*, 2014). A *Asterionellopsis glacialis* não responde significativamente ao aumento da concentração do CO<sub>2</sub> até às concentrações de 1500µatm, e outras variações no sistema de carbono (Barcelos e Ramos *et al.*, 2014) e o mesmo se verifica com os *Chaetoceros* sp..

A maioria das amostras encontra-se abaixo dos valores esperados de acordo com o ratio de Redfield. O mesmo se verificou com um estudo usando a *Asterionellopsis glacialis* onde os ratios elementares foram todos abaixo de Redfield (Barcelos e Ramos *et al.*, 2014).

Contrariamente ao observado em estudos superiores, no meu trabalho observou-se que para o meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante, verifica-se que as células contêm em média mais C e P que no meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro. Já no meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro as células contêm em média mais N que no meio onde as concentrações de CO<sub>2</sub> que simulam o futuro distante.

De acordo com, Barcelos e Ramos *et al.*, (2014) condições de excesso de nutrientes, menores taxas de divisão celular seriam esperadas para ser acompanhado por um aumento das quotas de elementos celulares, tendo sido observado até 1470µatm CO<sub>2</sub>. No entanto, as quotas de N, P e C diminuíram com o aumento do CO<sub>2</sub> 1470-3400µatm apesar da tendência de queda nas taxas de divisão celular.

## 2. O efeito da turbulência

Num ambiente de baixa turbulência, espera-se um aumento da taxa de divisão celular, aumentando assim o número de células numa dada cadeia independentemente do tipo de ligação entre células.

A turbulência de pequena escala pode ser benéfica para o fitoplâncton uma vez que aumenta a taxa de difusão de nutrientes à superfície da célula, sendo assim significativa apenas para o fitoplâncton de maiores dimensões (Sullivan, *et al* 2003) De acordo com Peters, *et al* (2000), as taxas de crescimento são, em geral, afectadas negativamente pela turbulência e pode afectar uma série de processos biológicos, principalmente relacionado com a distribuição de grandes quantidades de células na água. No entanto, não foi possível verificar qualquer alteração ou efeito no *Chaetoceros* sp., esta ausência de resposta provavelmente deve-se à intensidade da turbulência aplicada nas amostras. Talvez as amostras onde não era aplicado o factor turbulência tenham sido mexidas demasiadas vezes ao dia ou as amostras onde foi aplicado o factor turbulência tenham sido mexidas poucas vezes. Seria interessante para uma próxima experiência aumentar o factor turbulência para se verificar se acontecia alguma das coisas referidas pelos autores acima referenciados.

## 3. O efeito combinado

Estudos recentes demonstram que a turbulência de pequena escala pode ser benéfica para o fitoplâncton uma vez que aumenta a taxa de difusão de nutrientes na superfície celular, sendo assim significativa apenas para o fitoplâncton com maiores dimensões (Sullivan, *et al* 2003), assim como concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> levam a um aumento na produtividade do fitoplâncton e também promove o crescimento de grandes formações/cadeias de diatomáceas (Rost *et al.*, 2008).

Com este dois estudos, pode concluir-se que a longo prazo e a confirmar que se verificam as condições acima descritas nos estudos, com pouca turbulência, o aumento do CO<sub>2</sub> poderá ser benéfico para o fitoplâncton uma vez que com células maiores existe uma maior taxa de difusão dos nutrientes e um crescimento das colónias. Mas a concentração do CO<sub>2</sub> foi visto que pode alterar a espécie dominante de diatomácea (Tortell *et al.*, 2002), o que pode alterar toda a base da cadeia trófica.

Já com condições elevadas de CO<sub>2</sub> e combinado com turbulência elevada poderá não ser muito benéfico para as células, pois elas terem tamanhos maiores que

o actual pode ser muito bom para a absorção de nutrientes, mas também significa que existe uma área muito maior de parede celular, logo os efeitos da turbulência nas células e nas grandes colónias poderá ser nefasto e vai provocar um maior stress celular.

Uma vez que não se encontrou nenhuma resposta nas amostras com turbulência, aqui no efeito combinado também não se verifica nenhuma resposta, pois a espécie demonstrou ser bastante robusta em termos de CO<sub>2</sub> e também de turbulência.

#### **4. Implicação para o ecossistema, gestão e conservação da natureza**

As diatomáceas são dos grupos mais comuns de fitoplâncton, com vários milhares de espécies e com os mais diversos tamanhos (Dürselen *et al.*, 2010). Para além disso, contribuem com quase metade (45%) da produtividade primária marinha e são conhecidas como assimiladoras activas tanto do CO<sub>2</sub> como de bicarbonato para a fotossíntese de forma a contrariar a pouca disponibilidade de CO<sub>2</sub> no oceano (Wu *et al.*, 2010). A taxa de produção de matéria orgânica pelo conjunto de produtores primários determina a taxa de fluxo de energia e ainda toda a produção de todos os níveis tróficos em quase todo o ecossistema (Falkowski, *et al.*, 2007).

Como tal, pode-se assumir que a base de uma cadeia trófica marinha saudável está em grande parte dependente destes pequenos seres fotossintéticos. Uma vez que estas diatomáceas até são bastantes resistentes e tolerantes a alterações bruscas nas concentrações de CO<sub>2</sub> pode-se assumir que para o ecossistema não deve de haver grandes alterações, uma vez que quanto mais açúcar uma célula tiver disponível mais energia tem e maior desenvolvimento celular e quanto maior a quantidade de fitoplâncton disponível, mais alimento têm os restantes seres nos seguintes níveis tróficos.

O problema será como irão reagir as restantes espécies de fitoplâncton principalmente as que são muito mais sensíveis, como por exemplo os cocolitóforos. E até que ponto não será prejudicial a alteração da espécie de diatomácea dominante e se na cadeia trófica os seres vivos imediatamente a seguir aos produtores primários se vão conseguir adaptar a estas alterações e assim sucessivamente.

No âmbito da gestão e conservação da natureza é importante alertar a população em geral de que o problema das alterações climáticas não é só o

aquecimento global e alterações a nível meteorológico. As consequências destas alterações são visíveis em todo o lado. As alterações climáticas influenciam a pesca através dos seus efeitos na produção primária, interações na cadeia alimentar e no ciclo de vida e distribuição das espécies alvo (Blanchard *et al.*, 2012). Enquanto as mudanças na cadeia alimentar também são influenciados pela disponibilidade de produção primária (Brander, 2007), as alterações na produção primária são acompanhadas de alterações químicas e físicas do meio (Sarmiento, 2004).

Todas estas alterações têm consequências na vida humana. Muitos países estão completamente dependentes do alimento que retiram do mar e das actividades lúdicas associadas ao mar. Se todos os seres que nele habitam não forem protegidos e se não se incentivar a população geral em que a conservação é importante, toda a vida existente nos oceanos como nós conhecemos agora pode não se manter assim durante muito mais tempo.

Como tal, a criação de protocolos como o de Quioto é muito importante uma vez que os países aderentes têm metas de redução diferenciadas, adaptada à sua realidade, com o objectivo principal de uma redução estimada global das emissões em cerca de 5% ([www.apambiente.pt](http://www.apambiente.pt)).

## **5. Problemas encontrados e perspectivas futuras**

Durante toda a fase de pré-culturas foram surgindo algumas dificuldades da minha parte porque pela primeira vez estava a trabalhar com fitoplâncton e como nunca tinha trabalhado nesta área todo este processo foi uma enorme aprendizagem.

Os problemas ao longo deste ano foram alguns, a começar nas primeiras vezes que fiz a experiência e que ia acontecendo sempre alguma coisa errada na preparação do meio de cultura, fazendo com que tivesse de recomeçar. Para além disso, usei um filtro que vinha com defeito e não fez a filtração eficaz da água, assim como pequenos problemas com o espectrofotómetro que resultou na perda de algumas amostras.

Todos estes pequenos atrasos, no fundo foram benéficos, porque foram fazendo com que fosse aperfeiçoando todas as novas técnicas que fui aprendendo ao longo deste ano. Desde que acabei a licenciatura em Ciências do Mar, em 2008, nunca exerci e nunca trabalhei em laboratório, à excepção das aulas práticas do tempo de licenciatura. A quantidade de técnicas novas aprendidas foi enorme, desde

o simples método de recolha de água, o processo de filtração, a alteração do sistema de carbono, adição de nutrientes e todo o processo de cultura e inoculação de fitoplâncton no meio de cultura. Ainda no final da experiência, a fase de recolha, preparação e armazenamento das amostras, todas as análises aos vários parâmetros estudados com métodos completamente diferentes, a contagem celular e técnicas de sedimentação. Já na fase de tratamento de dados aprendi a trabalhar no MatLab e no programa de análise estatística R.

Do trabalho propriamente dito, a adição de nutrientes nos meios iniciais assim como as concentrações de CO<sub>2</sub> dos meios, ficaram um pouco diferentes ao esperado inicialmente, o que realmente foi uma pena, que era bastante mais interessante repetir a experiência com esses valores mais próximos dos propostos. Para além, de que seria interessante aumentar as concentrações de CO<sub>2</sub> dos meios que simulavam um futuro distante para ver se existia uma reacção por parte dos *Chaetoceros* sp., como se verificou com a *Asterionellopsis glacialis* (Barcelos e Ramos *et al.*, 2014).

Relativamente à turbulência, era interessante alterar as minhas condições de cultura, mexendo menos as culturas sem turbulência e as culturas onde simulava a turbulência serem mais mexidas e de forma diferente. Ou fazer uma plataforma para mexer as garrafas de uma forma diferente, talvez um método diferente assim como também conseguir arranjar forma de medir a agitação provocada pela turbulência de forma a se poder comparar com alguns artigos escritos sobre o assunto. Desta forma, em principio já seria visível alguma alteração na fisiologia dos *Chaetoceros* sp..

## **Bibliografia:**

- Barcelos e Ramos J, Schulz KG, Brownlee C, Sett S, Azevedo EB, (2014). *Effects of Increasing Seawater Carbon Dioxide Concentrations on Chain Formation of the Diatom Asterionellopsis glacialis*. PLoS ONE 9(3): e90749. (doi:10.1371/journal.pone.0090749).
- Blanchard, J. et al., (2012). *Potential consequences of climate change for primary production and fish production in large marine ecosystems*. Trans. R. Soc. B 2012 367. (doi: 10.1098/rstb.2012.0231).
- Brander, K. M., (2007) *Climate change and food security special feature: global fish production and climate change*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 104, 19 709–19 714. (doi:10.1073/pnas.0702059104).
- Brown E. et al., (1989). *Seawater: it's composition, properties and behavior*. The Open University, Oxford.
- Burkhardt S, Zondervan I, Riebesell U, (1999). *Effect of CO<sub>2</sub> concentration on C:N:P ratio in marine phytoplankton: A species comparison*. Limnol Oceanogr 44: 683–690.
- Burkhardt S, Amoroso G, Riebesell U, Sultemeyer D., (2001). *CO<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake in marine diatoms acclimated to different CO<sub>2</sub> concentrations*. Journal Limnology and Oceanography 46: 1378–1391.
- Dias, J., Ferreira, Ó. (2007). *Gestão costeira e conhecimento científico: Uma perspectiva integrada*. Colectânea de Ideias sobre a Zona Costeira de Portugal. Porto: Associação Eurocoast, p.229-237.
- Dickson, A. G., Millero, F. J. (1987). *A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media*, Deep-Sea Res., 34A, 1733–1743.
- Dikson, A.G., Afghan, J. D., Anderson, G. C. (2003). *Reference materials for oceanic CO<sub>2</sub> analysis: a method for the certification of total alkalinity*. Marine Chemistry 80, p. 185-197.
- Falkowsky, P., Knoll, A. (2007). *Evolution of primary producers in the sea*. Elsevier Academic Press. London. Cap.1, p. 2.
- Guillard, L., Ryther, H. (1962). *Studies of marine planktonic diatoms: 1. Cyclotella nana (Hustedt) and Detonula confervacea (Cleve Gran)*. Vol. 8, p. 229-239.
- Guillard, L. (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates: In culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press. New York, p. 29-60.
- Grasshoff, K., Kremling, K., Ehrhardt, M. (2002). *Methods of Seawater Analysis*, Wiley-VCH.
- IPCC. (2007). *Climate change 2007: The physical basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change*. Cambridge University Press. p.996.
- IPCC. (2011). *Workshop Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Workshop on Impacts of Ocean Acidification on Marine Biology and Ecosystems*. IPCC Working Group II Technical Support Unit. Carnegie Institution. p.164.
- Ihnken, S., Roberts, S., Beardall, J. (2011). *Differential responses of growth and photosynthesis in marine diatom Chaetoceros muelleri to CO<sub>2</sub> and light availability*. Phycology 50. p.182-193. (DOI: 10.2216/10-11.1).
- Kraberg, A., Baumann, M., Dürselen, C. (2010). *Coastal phytoplankton, photo guide for the Northern European Seas*, Alemanha: Dr. Friedrich Pfeil.



- Levasseur M., Thompson P. A., Harrison P. J., (1993) *Physiological acclimation of marine phytoplankton to different nitrogen sources*. Journal of Phycology. 09/1993; 29(5):587 - 595. (DOI:10.1111/j.0022-3646.1993.00587.x)
- Lewis, E., Wallace, R. (1998). *Program developed for CO<sub>2</sub> system calculations*, ORNL/CDIAC-105. Carbon Dioxide Information Analysis Center: Oak Ridge National Laboratory, US Department of Energy
- Mackinder, L. et al., (2011). *Expression of biomineralization-related ion transport genes in *Emiliania huxleyi**. Environmental Microbiology. Vol. 13(12), p. 3250–3265.
- Mehrbach, C., Culbertson, C. H., Hawley, J. E., and Pytkowicz, R. M. (1973). *Measurements of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure*, Limnol. Oceanogr., 18, 897–907.
- Nielsen, M.V. (1995) *Photosynthetic characteristics of the coccolithophorid *Emiliania huxleyi* (*Prymnesiophyceae*) exposed to elevated concentrations of dissolved inorganic carbon*. J Phycol 31:715–719.
- Paasche, E. (1964) *A tracer study of the inorganic carbon uptake during coccolith formation and photosynthesis in the coccolithophorid *Coccolithus huxleyi**. Physiol Plant (Suppl III):5–81.
- Peters, F., Marrasé, C. (2000) *Effects of turbulence on plankton: an overview of experimental evidence and some theoretical considerations (review)*. Institut de Ciències del Mar, Barcelona, Catalunya, Spain. Marine Ecology Progress series Vol. 205: 291–306, 2000, Published October 19.
- Peters F., Arin L., Marrasé C., Berdalet E., Sala M.M.. (2006) *Effects of small-scale turbulence on the growth of two diatoms of different size in a phosphorus-limited medium*. Institut de Ciències del Mar, CMIMA (CSIC), Pg. Marítim de la Barceloneta 37-49, E-08003 Barcelona, Catalunya, Spain. Elsevier B.V. (doi:10.1016/j.jmarsys.2005.11.012).
- Petersen, J. E, Sanford, L. P. and Kemp, W. M. (1998) *Coastal plankton responses to turbulent mixing in experimental ecosystems*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 171, 23–41.
- Tans, Pieter., Keeling, Ralph.- Scripps Institution of Oceanography. Disponible na internet:<[www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends](http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends)>
- Tortell, P.D., DiTullio, G.R., Sigman, D.M., Morel, F.M.M.. (2002) *CO<sub>2</sub> effects on taxonomic composition and nutrient utilization in an equatorial Pacific phytoplankton assemblage*. Mar Ecol Prog Ser 236:37–43
- Tortell, P. [et al.] (2008) *CO<sub>2</sub> sensitivity of Southern Ocean phytoplankton*. *Geophysical Research Letters (GRL) paper*. . (DOI:10.1029/2007GL032583).
- Ramon Margalef. (1997) *Turbulence and marine life*. Departament d'Ecologia, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Avda. Diagonal 645, 08028 Barcelona. Spain. Scientia Marina, SCI. MAR., 61 (Supl. 1): 109-123. Received December 15, 1995.
- Redfield, A.C., Ketchum, B.H., Richards, F.A. (1963). *The Influence of organisms on the composition of sea-water*. In: Hill MN (ed) *The sea. Ideas and observations on progress in the study of the seas. The composition of sea-water: Comparative and descriptive oceanography*. Vol 2. New York: Interscience Publishers, John Wiley & Sons. p. 26-77.
- Richard, A. et al., (2004). *Impact of Anthropogenic CO<sub>2</sub> on the CaCO<sub>3</sub> System in the Oceans*. Science 305: n° 5682 p. 362-366.
- Riebesell U, Wolf-Gladrow D, Smetacek V (1993) *Carbon dioxide limitation of marine phytoplankton growth rates*. Nature 361: 249–251.

Rost B, Riebesell U, Burkhardt S, Sültemeyer D (2003) *Carbon acquisition of bloom-forming marine phytoplankton*. *Limnol Oceanogr* 48:55–67.

Riebesell, U. et al., (2010). *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting*. Luxembourg: Publications Office of the European Union. p. 260.

Rhein, M. et al., (2013). *Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate*. Cambridge: Cambridge University Press.

Rost, Björn, Zondervan Ingrid, Wolf-Gladrow, Dieter, (2008). *Sensitivity of phytoplankton to future changes in ocean carbonate chemistry: current knowledge, contradictions and research directions*. *Marine Ecology Progress series*. Vol. 373: 227–237. (doi: 10.3354/meps07776).

Sabine, C. et al., (2004). *The Oceanic Sink for Anthropogenic CO<sub>2</sub>*. *Science* 305 (5682). p. 376-371.

Sarmiento, J. (2004). *Response of ocean ecosystems to climate warming*. *Glob. Biogeochem. Cycle* 18, p.3–23.

Sharp, J. (1974). *Improved analysis for particulate organic carbon and nitrogen from seawater*. *Limnol: Oceanogr.* 19, p. 984-989.

Sournia, Alain. (1986). *Atlas du Phytoplancton Marin*. Éditions du Centre National de La Recherche Scientifique, Paris, 516p.

Stoll M.H.C. [et al.] (2001). *Continuous-flow analysis of dissolved inorganic carbon content in seawater*. *Analytical Chemistry*. Vol.73, p. 4111-4116.

Sullivan J. M., and Swift E.. (2003). *Effects of small-scale turbulence on net growth rate and size of ten species of marine dinoflagellates*. *Journal of Phycology*, Volume 39, Issue 1, pages 83–94, February 2003, (DOI: 10.1046/j.1529-8817.2003.02094.x)

Svendsen, H. (1997) *Physical oceanography and marine ecosystems: some illustrative examples*. *Sci. Mar.*, 61, 93–108.

Utermöhl, H. (1958). *Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik*. *Limnol: Mitt int Verein*, Vol.9, p. 1-38.

Wu, Y.; Gao, K.; Riebesell, U. (2010). *CO<sub>2</sub>-induced seawater acidification affects physiological performance of the marine diatom Phaeodactylum tricorutum*, *Biogeoscience*, Vol.7, p. 2915-2923.

Páginas da internet:

[www.apambiente.pt](http://www.apambiente.pt)

[oceano.org](http://oceano.org)

[marinespecies.org](http://marinespecies.org)

[micro.sakura.ne.jp](http://micro.sakura.ne.jp)

Imagem da capa:

*Chaetoceros constrictus*, retidara do site: [www.diatomloir.eu](http://www.diatomloir.eu)