



Patrícia Alexandra Afonso Barros

Licenciatura em Ciências de Engenharia do Ambiente

**Análise do Efeito da Acidificação dos
Oceanos no Desenvolvimento Larvar de
*Crassostrea gigas***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia do Ambiente – Perfil Engenharia Ecológica

Orientador: Maria Paula Oliveira Sobral, Professora Doutora,
UNL-FCT

Co-orientador: Domitília Matias, Mestre, INRB, I.P./L-IPIMAR



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2011

Análise do Efeito da Acidificação dos Oceanos no Desenvolvimento Larvar de *Crassostrea gigas*

Copyright © Todos os direitos reservados a Patrícia Barros, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria Paula Sobral e à Mestre Domília Matias muito agradeço a oportunidade de trabalhar neste tema e de poder realizar este trabalho de investigação, assim como a orientação activa, o apoio, encorajamento, tempo dispendido, perseverança e por todas as sugestões cruciais.

Ao Doutor Costa Monteiro, Director do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INBR, I.P./L-IPIMAR) e à Doutora Alexandra Leitão coordenada do Grupo de Produção de Bivalves, pela oportunidade de poder realizar este estudo nas instalações da Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira e por todos os recursos disponibilizados.

Ao Doutor Pedro Range, cujo auxílio e assistência foram determinantes no circuito de cultura larvar e pela disponibilidade na recolha dos dados de pH e temperatura do programa Aqua Medic AT Control.

À Engenheira Margarete Matias, pela valiosa ajuda na recolha e manuseamento da ostra japonesa, recolha dos gâmetas sexuais e por toda a prestabilidade durante o processo de amostragem e limpeza dos tanques de cultivo larvar, assim como toda a ajuda com o programa ImageJ, simpatia e tempo dispendido ao longo de todo o trabalho de investigação.

Ao Doutor Frederico Batista, pela disponibilidade e fornecimento de informação.

À Dr.^a Sandra Joaquim, por estar sempre disponível para qualquer questão.

Ao Senhor Maurício Teixeira, pela produção dos filtros larvares e por toda a assistência durante os ensaios experimentais.

À Joana Sousa, Eloíse de Sá e Ana Catarina Grade, toda a disponibilidade, simpatia e amizade durante a minha estadia na Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira.

Aos amigos Ana Ribeiro, Teresa Meira, Ângela Maria Abreu, Joana Martins, João Frias, João Cavaleiro, Ivo Louro, Melanie Rosalino e Rita Reis que me acompanharam, pela ajuda, palavras de conforto, carinho e motivação.

E à minha família sobretudo ao meu pai, mãe e irmão, pelo forte apoio, força, afecto, compreensão, paciência e motivação que sempre recebi.

RESUMO

Os oceanos, como sumidouros de CO₂ atmosférico, enfrentam uma grave alteração no seu ciclo biogeoquímico natural dada a veloz absorção de CO₂ gerado antropogenicamente. A acidificação dos oceanos é o termo geral usado para o fenómeno de decréscimo de pH dos oceanos a partir da absorção de CO₂ atmosférico, diminuindo a concentração de CO₃²⁻ e o estado de saturação de aragonite e calcite. Estas alterações modificam a dinâmica dos ecossistemas marinhos e desafiam a adaptação de várias espécies dependentes do ciclo de carbono inorgânico do oceano. Para avaliar os efeitos deste fenómeno, focou-se no estágio larvar dos bivalves pela produção de uma frágil estrutura calcária bastante sensível a alterações na química da água do mar. Neste contexto, investigou-se o efeito da acidificação dos oceanos na mobilidade do esperma, taxa de fecundação e viabilidade larvar (sobrevivência, crescimento e anormalidades) da ostra japonesa, *Crassostrea gigas*, um bivalve de elevado valor comercial, em ensaios com perturbações controladas de CO₂. Foi manipulada a química de carbonatos na água do mar através da injeção directa de CO₂ puro, para atingir dois níveis reduzidos de pH (-0,4 e -0,7 unidades, cenários previstos pelo IPCC e Caldeira e Wickett, 2003, respectivamente) posteriormente comparados com um meio não manipulado. Os resultados revelaram uma elevada sensibilidade da larva velígera de *C. gigas* a baixos níveis de pH. Em geral, foram encontradas diferenças entre os pH na mobilidade do esperma, taxa de fecundação, sobrevivência, crescimento e ocorrência de prodissoconchas anormais e proturberância do manto. O impacto do pH 7,4 na fecundação e viabilidade larvar é maior do que o impacto do pH 7,7. Estes resultados sugerem que o sucesso de reprodução e os mecanismos biológicos de calcificação são interrompidos prematuramente quando expostos a um meio acidificado e influenciam a viabilidade da larva velígera de *C. gigas* comprometendo a sua sobrevivência.

Palavras-chave: dióxido de carbono, acidificação, oceano, bivalves, *Crassostrea gigas*

ABSTRACT

Oceans, as sinks of atmospheric CO₂, face a serious change to their natural biogeochemical cycle due to the rapid absorption of CO₂ generated anthropogenically. Ocean acidification is the common term used to describe the decrease of ocean pH phenomenon caused by the absorption of atmospheric CO₂ which consequently reduces the concentration of CO₃²⁻ and saturation state of aragonite and calcite. These changes challenge the adaptation of several species that depend actively on the ocean inorganic carbon cycle. To evaluate the effects of ocean acidification, we focused on the larval stage of bivalves which produce a fragile calcareous skeletal structure, very sensitive to changes in seawater chemistry. In this context, we investigated the effect of ocean acidification on sperm mobility, fertilization rate and larval viability (survival, growth and abnormalities) of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, a commercially important bivalve, in controlled CO₂ perturbation experiments. The carbonate chemistry of seawater was manipulated by diffusing pure CO₂, to attain two reduced pH levels (by -0.4 and -0.7 pH units, scenarios from IPCC data, and Caldeira & Wickett, 2003, respectively), which were compared to unmanipulated seawater. The results show high sensibility of the *C. gigas* veliger larvae to low levels of pH. In general, sperm mobility, fertilization rate, survival, growth and occurrence of prodissoconch abnormalities and protruding mantle were different on manipulated and unmanipulated pH. The impact of pH 7.4 in the fertilization and larval viability was higher than in pH 7.7. The results suggest that the reproductive success and the biological mechanisms for calcification may be prematurely interrupted when exposed to an acidified environment and influence the viability of *C. gigas* veliger larvae, compromising the settlement.

Keywords: carbon dioxide, acidification, ocean, bivalve, *Crassostrea gigas*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Acidificação dos Oceanos: Conceitos-chave, Efeitos e Consequências	2
1.1.1 Oceano: Fonte ou sumidouro de carbono atmosférico?	2
1.1.2 CO ₂ nas zonas costeiras e estuarinas.....	10
1.1.3 Consequências da acidificação dos oceanos.....	12
1.2 Enquadramento	18
1.3 Objectivos.....	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1 Caracterização da espécie.....	23
2.2 Procedimento experimental.....	25
2.2.1 Montagem do circuito de cultura larvar.....	25
2.3 Ensaio Experimentais	28
2.3.1 Efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar de <i>C. gigas</i>	28
2.3.1 Efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar de <i>C. gigas</i>	34
2.4 Alimentação.....	37
2.5 Tratamento estatístico	37
3. RESULTADOS	39
3.1 Efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar de <i>C. gigas</i>	39
3.2 Efeito da acidificação sobre a fecundação e desenvolvimento larvar de <i>C. gigas</i>	45
4. DISCUSSÃO	53
4.1 Mobilidade do esperma e Taxa de fecundação	53
4.2 Taxa de Eclosão Larvar	54
4.3 Mortalidade Larvar.....	54
4.4 Larvas Velígeras Anormais	55
4.5 Crescimento Larvar	56
5. CONCLUSÃO.....	59
6. CONSIDERAÇÕES FUTURAS.....	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo global do carbono, com referência ao tamanho dos reservatórios de carbono (1Gt = 10^{15} gramas) (Holmen, 2000; Raven <i>et al.</i> , 2005).	3
Figura 1.2 Curva de Keeling, média mensal de CO ₂ atmosférico (ppm) (Tans e Keeling, 2011).	4
Figura 1.3 Fontes de CO ₂ e quantidades absorvidas pelos reservatórios naturais, entre os anos 2000-2009 (Assmann <i>et al.</i> , 2010)	5
Figura 1.4 Fração das emissões totais de CO ₂ que permanecem na atmosfera, <i>Airborne Fraction</i> (Assmann <i>et al.</i> , 2010)	6
Figura 1.5 Média anual para o fluxo de CO ₂ no sistema ar-água, em águas superficiais (condições de não-El Niño) (Takahashi <i>et al.</i> , 2009).	8
Figura 1.6 Comportamento do fluxo médio diário de CO ₂ nos estuários do Douro e Sado (Oliveira <i>et al.</i> , 2011).....	11
Figura 1.7 Variação do fluxo de CO ₂ nos estuários do Sado e Tejo, entre 1999 e 2007 (Oliveira <i>et al.</i> , 2011).	12
Figura 1.8 Diagrama das três formas de CID, em meio aquoso (Tyrell, 2011)	13
Figura 1.9 Emissões antropogénicas de CO ₂ , níveis históricos de CO ₂ atmosférico e previsão das concentrações de CO ₂ a partir do cenário de emissões IS92a, juntamente com alterações no pH de acordo com a química horizontal média (Caldeira e Wickett, 2003).....	15
Figura 1.10 Projecção da concentração de CO ₃ ²⁻ versus CO ₂ atmosférico até ao ano 2100, de acordo com os cenários A2 e B1 (<i>business-as-usual</i>) (Gattuso <i>et al.</i> , 2009).....	17
Figura 2.1 Larvas velígeras “D”, de <i>Crassostrea gigas</i>	24
Figura 2.2 Larva velígera umbolada (Zardus e Martel, 2002).....	25
Figura 2.3 Tanques de distribuição (250L); o fluxo de passagem de água ocorre da direita para a esquerda.....	26
Figura 2.4 Circuito de abastecimento contínuo de água salgada e sistema de difusão de CO ₂	27
Figura 2.5 Tanques de cultivo larvar (20L), cada com um tubo ladrão associado, um filtro de 30µm no interior, um eléctrodo de leitura de pH, um tubo de alimentação e um tubo de saída de água.	28
Figura 2.6 <i>Crassostrea gigas</i> aberta, com exposição da gónada.....	29
Figura 2.8 Espermatozóides de <i>Crassostrea gigas</i> à volta do ovócito (56µm=0,56mm).	30
Figura 2.7 Esfregaço de ovócitos de <i>Crassostrea gigas</i> , alguns ainda em forma de pêra.	30
Figura 2.9 Aparecimento das primeiras divisões de <i>Crassostrea gigas</i> , três horas após fecundação. .	31

Figura 2.10 Esquema do processo de manipulação dos gametas de <i>Crassostrea gigas</i> , fecundação e distribuição nos tanques de cultivo larvar a análise do efeito sobre o desenvolvimento larvar.	32
Figura 2.11 Larva velígera “D” de <i>Crassostrea gigas</i> em pormenor. md – margem dorsal, ma – margem anterior, mp – margem posterior, mv – margem ventral, ℓ – comprimento antero-posterior e h – altura dorso-ventral.	34
Figura 2.12 Esquema do processo de manipulação dos gametas de <i>C. gigas</i> , fecundação e distribuição nos tanques de cultivo larvar, para a análise do efeito sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.	36
Figura 3.1 Taxa de eclosão larvar média (%) de <i>Crassostrea gigas</i> , 36h após fecundação, nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP, n=3).	39
Figura 3.2 Taxa de mortalidade média larvar (%) de <i>Crassostrea gigas</i> , ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3)	40
Figura 3.3 Taxa média de velígeras anormais (%) de <i>Crassostrea gigas</i> , ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3).	42
Figura 3.4 Variação do comprimento antero-posterior médio larvar (µm) de <i>Crassostrea gigas</i> , ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3 e n*=2).	43
Figura 3.5 Variação da altura dorso-ventral média larvar (µm) de <i>Crassostrea gigas</i> , ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3 e n*=2).	44
Figura 3.6 Taxa de fecundação (%), de <i>Crassostrea gigas</i> , nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.	46
Figura 3.7 Taxa de eclosão média larvar (%), de <i>Crassostrea gigas</i> , 48h após fecundação, nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3).	46
Figura 3.8 Taxa de mortalidade média larvar (%), de <i>Crassostrea gigas</i> , ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3 e n*=2).	47
Figura 3.9 Taxa de velígeras anormais (%), de <i>Crassostrea gigas</i> ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média ±EP; n=3 e n*=2).	49
Figura 3.10 Variação do comprimento médio larvar antero-posterior (µm), de <i>Crassostrea gigas</i> , ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média ±EP; n=3).	50

Figura 3.11 Variação da altura média larvar dorso-ventral (μm) de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média \pm EP; n=3). 51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Média anual do fluxo de CO ₂ no sistema ar-água, em águas superficiais (PgC. ano ⁻¹) nas quatro principais bacias oceânicas para a referência do ano 2000 baseado em 3,0 milhões de medições de pCO ₂ (Takahashi <i>et al.</i> , 2009).	9
Tabela 2.2 Cronologia da amostragem dos parâmetros avaliados na análise do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar	33
Tabela 2.3 Cronologia da amostragem dos parâmetros avaliados na análise do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.....	36
Tabela 3.4 Exemplos da variação na morfologia da larva velígera “D” de <i>Crassostrea gigas</i> , nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.	40
Tabela 3.5 Comparação da taxa de velígeras “D” normais e anormais (%) de <i>Crassostrea gigas</i> , durante o efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP;n=3).	42
Tabela 3.6 Contagem de ovos fecundados e não fecundados de <i>Crassostrea gigas</i> ao fim de 2h, 3h e 4h após a fecundação <i>in vitro</i> , nos três tratamentos em estudo nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.....	45
Tabela 3.7 Comparação da taxa de velígeras “D” normais e anormais (%) de <i>Crassostrea gigas</i> , nos três tratamentos em estudo para ensaio sobre o efeito do pH na taxa de fecundação e desenvolvimento larvar (média±EP;n=3 e n*=2).....	48
Tabela 3.8 Exemplos da variação na morfologia da larva velígera “D” de <i>Crassostrea gigas</i> nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

α – Nível de significância

μl - Microlitro

μm – Micrómetro

$\Delta p\text{CO}_2$ – Variação da pressão parcial do dióxido de carbono; potencial termoquímico condutor de CO_2

ACC – Amorphous Calcium Carbonate

AF – Airborne fraction

Ca^{2+} - Ião cálcio

CaCO_3 – Carbonato de cálcio

CO_2 – Dióxido de carbono

CO_3^{2-} - Ião carbonato

CID – Carbono Inorgânico Dissolvido

df – Grau de liberdade

EP – Erro-padrão

GEE – Gases de Efeito de Estufa

Gt – Gigatoneladas

H^+ - Ião hidrogénio

HCO_3^- - Ião bicarbonato

H_2CO_3 – Ácido carbónico

IGBP - International Geosphere-Biosphere Programme

IMBER – Integrated Marine Biogeochemistry and Ecosystem Research

INBR, I.P./L – Instituto Nacional de Recursos Biológicos

IPIMAR – Instituto de Investigação das Pescas e do Mar

IPCC – International Panel on Climate Change

IS92a – Cenário de consumo de energia “*business-as-usual*”, caracterizado pelo IPCC

K'_{sp} – produto de solubilidade estequiométrico

K-W. – Teste não-paramétrico Kruskal-Wallis

n – Número de amostras

P – Probabilidade de se observar o efeito desejado

$p\text{CO}_2$ – Pressão parcial do dióxido de carbono

Pg – Petagrama (10^{15} gramas)

ppm – Partes por milhão

ppmv – Partes por milhão em volume

rpm – Rotações por minuto

SCOR – Scientific Committee on Oceanic Research

SOLAS - Surface Ocean Lower Atmosphere Study

Tg – Teragrama (10^{12} gramas)

U.V. – Ultra-Violeta

1. INTRODUÇÃO

"How inappropriate to call this planet Earth when it is quite clearly Ocean!"

Arthur C. Clarke

Os oceanos são um dos recursos mundiais fundamentais e apresentam-se como um dos mais importantes componentes da natureza tendo em conta o seu papel vital no planeta, como suporte de bens e serviços. Ocupam 71% da superfície terrestre (Garcia, 2004) e estendem-se numa superfície de 362 milhões de km² (Massoud, 1992). Com um volume de $1,37 \times 10^6$ km³ constituem o maior repositório de organismos do planeta, representativos de 31 filos (Nybakken, 2001).

Terra, rios, mar aberto, atmosfera, sedimentos e biota interagem com zonas costeiras e plataformas continentais, levando a uma heterogeneidade temporal e espacial substancial dos fluxos de carbono (Chen e Borges, 2009). Nos últimos 250 anos, as actividades humanas têm vindo a acelerar as emissões de gases de efeito de estufa (GEE), particularmente as emissões de dióxido de carbono (CO₂) contabilizando-se cerca de $7,7 \pm 0,5$ Gt de carbono por ano, entre 2000 e 2009, sobretudo pelo consumo de combustíveis fósseis (Assmann *et al.*, 2010). Os níveis de CO₂ na atmosfera passaram de 280 ppmv (partes por milhão em volume), ao nível pré-industrial, para 384 ppmv em 2007 (Solomon *et al.*, 2007; Doney *et al.*, 2009b). Isoladamente, os oceanos absorvem cerca de 25% do CO₂ atmosférico de origem antropogénica (Feely, 2008) correspondendo a cerca de um-terço do CO₂ antropogénico produzido nos últimos 200 anos (Sabine *et al.*, 2004). As trocas gasosas do sistema ar-água vão acompanhando este aumento de carbono atmosférico mas a um custo. À medida que o CO₂ aumenta, a pressão parcial do CO₂ (pCO₂) também vai aumentando (fenómeno conhecido como hipercapnia) na água do mar, a concentração de iões hidrogénio cresce, a concentração de iões carbonato diminui e a capacidade de absorção adicional de CO₂ fica limitada.

A absorção de carbono antropogénico desde 1750 tem sido responsável pela diminuição média do pH em 0,1 unidades (Bernstein *et al.*, 2007), actualmente o pH médio dos oceanos é de 8,1. Apesar do decréscimo de pH ser apenas de 0,1 unidades é importante lembrar que a escala de pH baseia-se numa escala logarítmica e portanto um decréscimo de décimas pode ter elevadas ramificações fisiológicas (Ringwood e Keeppler, 2002). Ainda que a absorção de CO₂ pelos oceanos venha a atenuar a dimensão do aquecimento global, este desequilíbrio no pH dos oceanos tende a afectar profundamente o biota marinho. Estas alterações podem acontecer ao nível do decréscimo de saturação do carbonato de cálcio (CaCO₃) (Fabry *et al.*, 2008) ou por via de distúrbios ácido-base (metabólicos) afectando a reprodução e o crescimento de populações e até mesmo espécies (Pörter *et al.*, 2004).

Em particular, é esperado que a acidificação progressiva tenha impactes negativos sobre o processo de calcificação utilizado por vários organismos na produção de conchas ou placas a partir de carbonato de cálcio (CaCO₃) (e.g. corais, pterópodes, bivalves, crustáceos) e sobre as

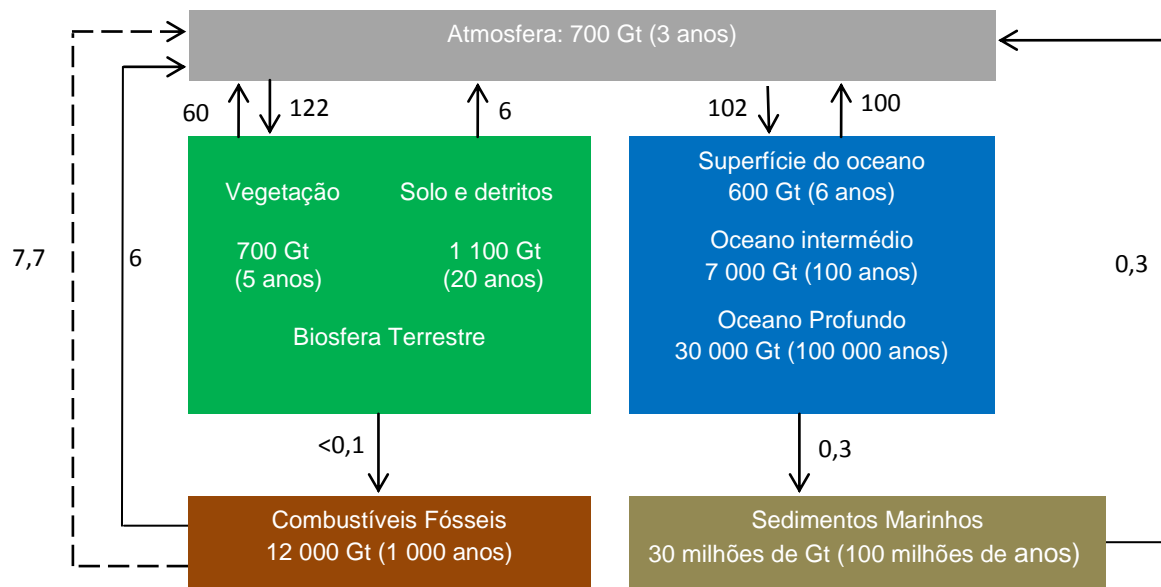
espécies que deles dependem (Bernstein *et al.*, 2007). São estes consumidores primários que estão na base da cadeia alimentar marinha e sustentam os restantes níveis tróficos. O seu desaparecimento ou redução poderá condicionar em grande escala a existência de outras espécies (e.g. mais de 60% da dieta do salmão juvenil é composta por pterópodes (Fabry, *et al.*, 2009)) e em última instância contribuir para um futuro desequilíbrio sócio-económico, uma vez que os moluscos, por exemplo, formam uma parte significativa da produção mundial de pesca e aquacultura (Csirke, 2005).

A acidificação dos oceanos não é uma consequência directa das alterações climáticas mas sim uma consequência das excedentes emissões antropogénicas de carbono atmosférico (Denman *et al.*, 2007) que têm ocorrido nas últimas décadas. É necessário agir agora para evitar o risco de danos irreversíveis nos oceanos (Caldeira *et al.*, 2005).

1.1 Acidificação dos Oceanos: Conceitos-chave, Efeitos e Consequências

1.1.1 Oceano: Fonte ou sumidouro de carbono atmosférico?

O carbono (C) é o quarto elemento químico mais abundante no planeta e é um dos componentes fulcrais na sua constituição (NASA, 2010a), porque se comporta como um átomo neutro capaz de se combinar com outros átomos, quer electropositivos quer electronegativos. Está presente nos oceanos sob forma mineral, de bicarbonatos, carbonatos e dióxido de carbono dissolvido (Massoud, 1992), constituindo o sistema inorgânico de carbono. O seu ciclo natural engloba a terra, os oceanos e a atmosfera e daí ser caracterizado como um dos grandes ciclos biogeoquímicos (NASA, 2010a) (fig. 1.1). Nos oceanos, os bicarbonatos resultantes da alteração das rochas calcárias superficiais dos continentes – provocada pela acidez natural das águas pluviais e favorecida pela meteorização e pela erosão mecânica – e transportados pelos rios, precipitam sob a forma de carbonatos constituintes do exosqueleto e da concha dos animais marinhos (Massoud, 1992).



- () – tempos de residência do carbono, em anos
- - fluxos de transferência de CO₂ entre reservatórios (Gt.ano⁻¹)
- - período 2000-2009 (Assmann *et al.*, 2010)

Figura 1.1 Ciclo global do carbono, com referência ao tamanho dos reservatórios de carbono (1Gt = 10¹⁵ gramas) (Holmen, 2000; Raven *et al.*, 2005).

Em terra, a maior retenção de carbono da atmosfera faz-se sob a sua forma gasosa (CO₂) e deve-se sobretudo à absorção pela vegetação, por fotossíntese, e à sua libertação para a atmosfera, por respiração, criando assim oscilações na concentração de CO₂ (fig. 1.2) (NASA, 2010a). Mas o CO₂ também circula entre a atmosfera e os oceanos, sobretudo à superfície dos oceanos, onde os organismos marinhos fazem circular o CO₂ a uma taxa muito comparável aos processos biológicos terrestres (Raven *et al.*, 2005). No entanto, ao longo dos anos estes fluxos bioquímicos têm assumido uma tendência de crescimento exponencial que acompanha o aumento de CO₂ atmosférico originado pelo consumo acelerado de combustíveis fósseis e alteração do uso do solo. Uma vasta gama de medidas directas e indirectas confirmam que o rácio de CO₂ atmosférico aumentou globalmente cerca de 100 ppm (36%) ao longo dos últimos 250 anos, de uma gama de 275 a 285 ppm na era pré-industrial (anos 1000-1750 dC) para 379 ppm em 2005, confirmado pela *Scripps Institution of Oceanography* (SIO) e pela agência *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) (Foster *et al.*, 2007). As primeiras medições contínuas *in situ* de CO₂ atmosférico feitas por um analisador de gás infravermelho de alta pressão não-dispersivo foram implementadas por Charles D. Keeling no SIO, em 1958, em Mauna Loa no Hawaii (Foster *et al.*, 2007). Na figura 1.2 vê-se o crescimento das médias mensais de CO₂ atmosférico, mostrando um aumento de 60 ppm nos últimos 50 anos.

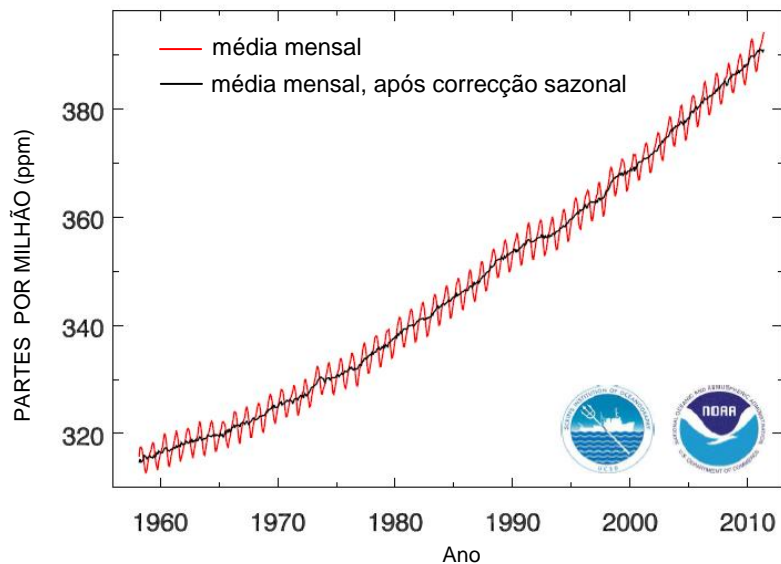


Figura 1.2 Curva de Keeling, média mensal de CO₂ atmosférico (ppm) (Tans e Keeling, 2011).

Depois de CO₂ entrar na atmosfera, as trocas gasosas com os elementos da biosfera terrestre e a superfície dos oceanos são bastante aceleradas e posteriormente é redistribuído numa escala de tempo de centenas de anos entre todos os reservatórios activos, incluindo a biosfera terrestre e o fundo dos oceanos (Foster *et al.*, 2007).

Nos oceanos, as trocas de CO₂ ocorrem muito facilmente e são controladas principalmente pelas temperaturas à superfície, correntes de circulação e pelos processos biológicos de fotossíntese e respiração (NASA, 2010a) e da turbulência das águas (Ho, 2006). A absorção de CO₂ é favorecida particularmente quando a temperatura do oceano à superfície é mais fria, dado a maior solubilidade do CO₂ em águas de baixas temperaturas. Em águas mais quentes, como nos trópicos, poderá ocorrer libertação de CO₂ para a atmosfera, desde o fundo do oceano (NASA, 2010a).

A vida no oceano consome e liberta grandes quantidade de CO₂, mas ao contrário do que acontece em terra o ciclo de carbono entre a fotossíntese e a respiração varia muito rapidamente uma vez que não existem efectivos de armazenamento de CO₂, como as árvores ou o solo. Existem extensas populações de plâncton fotossintético (fitoplâncton) que alimentam grandes quantidades de plâncton animal (zooplâncton) em poucos dias ou semanas (NASA, 2010a). No que diz respeito ao carbono residual do zooplâncton, pode dizer-se que as quantidades são bastante reduzidas uma vez que as taxas de deposição no fundo dos oceanos se realizam a uma escala temporal muito longa. Em suma, pode dizer-se que o oceano é um sumidouro eficaz quando uma população de fitoplâncton retira mais CO₂ através da fotossíntese do que aquele que é devolvido pela respiração por toda a comunidade (fitoplâncton e zooplâncton, e outros organismos que vivem nas camadas superficiais) (Ho, 2006).

A extração e a utilização do carbono, como combustível, armazenado no subsolo – subtraído ao seu ciclo, portanto – iniciaram-se no séc. XVIII com o carvão e prosseguiram com no séc. XIX com o petróleo e o gás natural (Massoud, 1992). Desde então, a emissão de carbono sob a forma de CO₂ tem vindo a aumentar criando um excesso de Gases com Efeito de Estufa (GEE) – substâncias presentes na atmosfera que têm a facilidade de permitir a passagem dos raios solares e de reter o calor depois de irradiado pela superfície da Terra (Garcia, 2006). Hoje em dia a grande massa de CO₂ que é libertado por via antropogénica é gerada sobretudo por duas grandes fontes de emissão: consumo de combustíveis fósseis, em todas as suas vertentes (carvão, gás, produção de cimento, petróleo) e alteração de uso do solo, grande parte por desflorestação e queima de biomassa e mais de metade dessas concentrações emitidas são absorvidas pelos dois grandes reservatórios/sumidouros naturais: as grandes florestas e os oceanos (fig. 1.3).

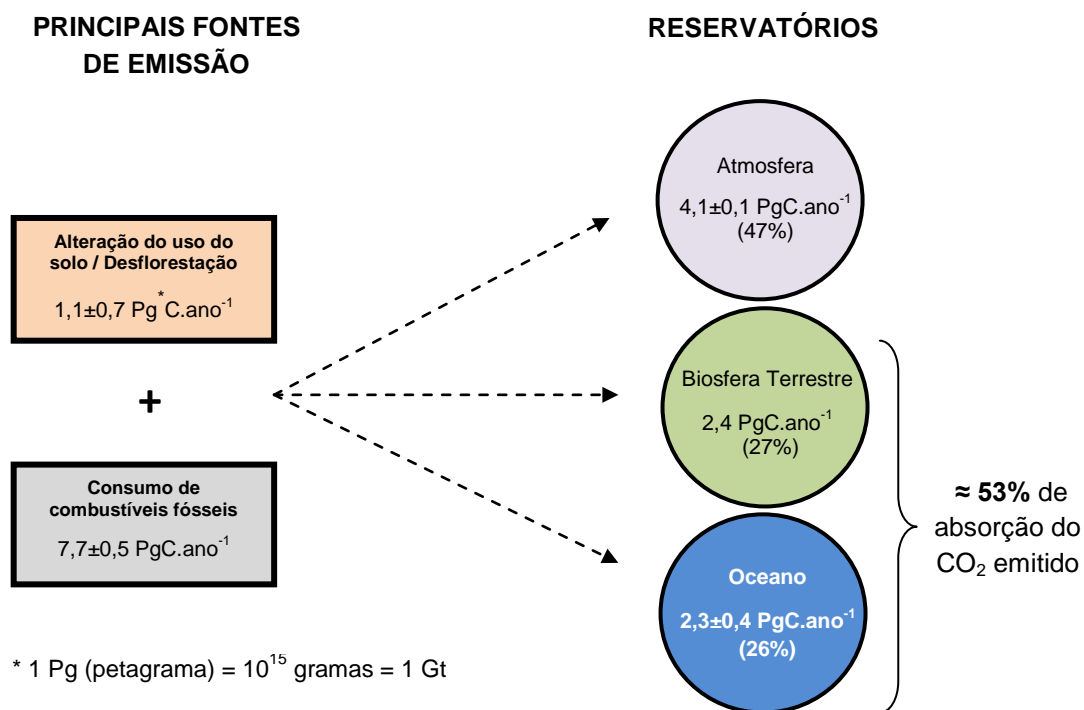


Figura 1.3 Fontes de CO₂ e quantidades absorvidas pelos reservatórios naturais, entre os anos 2000-2009 (Assmann *et al.*, 2010)

O carbono contido no CO₂ tem dois isótopos estáveis, ¹²C e ¹³C, sendo que ¹²C é o mais abundante. Quando o CO₂ é libertado antropogenicamente apresenta um rácio ¹³C/¹²C menor do que o CO₂ atmosférico e cada um apresenta uma assinatura da fonte de onde foi libertado (Foster *et al.*, 2007). Assim, quando o CO₂ originado na combustão de combustíveis fósseis entra na atmosfera, o rácio ¹³C/¹²C no CO₂ atmosférico decresce a uma taxa previsível consistente com as emissões de CO₂ de origem fóssil (Foster *et al.*, 2007). Estas alterações podem ser medidas facilmente usando espectrometria de massa para determinar o rácio de isótopos (Foster *et al.*, 2007) sendo assim possível estimar as taxas de CO₂ antropogénico que é emitido para a atmosfera e posteriormente armazenado nos sumidouros/ reservatórios naturais.

A relação entre o aumento do rácio de mistura de CO₂ atmosférico e as suas emissões tem sido monitorizada através de um factor de escala conhecido como fracção aérea - *airborne fraction* (AF) (Foster *et al.*, 2007), definido como a relação entre o aumento de CO₂ atmosférico num determinado ano com as emissões totais desse ano (Canadell *et al.*, 2007), isto é, o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera associado às emissões de combustíveis fósseis (Denman *et al.*, 2007). A emissão por alteração do uso do solo não está incluída nesta definição, pela dificuldade de quantificar a sua contribuição (Denman *et al.*, 2007). Um aumento da AF pode implicar um aumento de CO₂ na atmosfera para uma determinada taxa de queima de combustíveis fósseis, isto pode significar uma certa ineficiência nos sumidouros naturais (Canadell *et al.*, 2007).

Alterações significativas da AF têm-se vindo a verificar (Canadell *et al.*, 2007), partindo de uma média de 0,43 até 1959 (Raupach *et al.*, 2008) efectua-se agora um aumento de 0,31%ano⁻¹ (Assmann *et al.*, 2010) (fig. 1.4). A AF tem uma grande variabilidade de ano para ano principalmente devido à resposta de sumidouros naturais, particularmente receptores terrestres (fig. 1.3), a variabilidade climática anual (*i.e.* El Niño) e erupções vulcânicas (Canadell *et al.*, 2007).

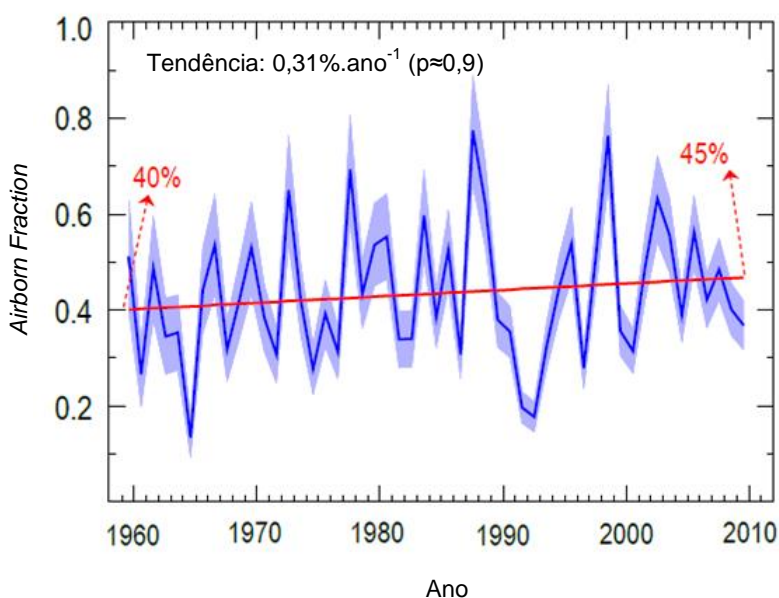


Figura 1.4 Fração das emissões totais de CO₂ que permanecem na atmosfera, *Airborne Fraction* (Assmann *et al.*, 2010)

O oceano, com as suas reservas de 38 biliões de toneladas de carbono sob a forma de carbonatos dissolvidos, comporta-se como um regulador das trocas com a atmosfera (Massoud, 1992). Se o teor de carbono diminui na atmosfera, o oceano liberta uma quantidade que contrabalança esse decréscimo. Inversamente, quando esse teor aumenta, o oceano absorve o excedente. Foi através deste sistema de libertação e de absorção que o teor de carbono se manteve estável na atmosfera durante milhares de anos. Pode dizer-se que o oceano tem uma capacidade tampão em relação ao aumento do CO₂ atmosférico. Mas a absorção oceânica é lenta: são necessários vários séculos para que as águas superficiais, que absorveram o gás, sejam transportadas e misturadas nas camadas intermédias e profundas dos oceanos (Denman *et*

al., 2007). O oceano levará séculos ou dezenas de séculos para absorver o excesso de carbono atmosférico gerado pelas actividades humanas.

Actualmente, o fluxo de CO₂ entre a atmosfera e a superfície oceânica pode ser estimado. O potencial termoquímico condutor de CO₂, em toda a superfície do mar, pode ser calculado pela diferença entre a pressão parcial de CO₂ (pressão que o CO₂ exerce individualmente) à superfície da água do mar, (pCO₂)_{sw}, e a pressão parcial de CO₂ na massa de ar sobrejacente, (pCO₂)_{air} (Takahashi *et al.*, 2009),

$$\Delta pCO_2 = [(pCO_2)_{sw} - (pCO_2)_{air}] \quad (1)$$

Por exemplo, quando (pCO₂)_{air} é maior do que (pCO₂)_{sw}, ΔpCO₂ é negativo e o CO₂ atmosférico é absorvido pela água do mar (Takahashi *et al.*, 2009). O fluxo líquido de CO₂ por toda a área marítima pode ser estimado pela multiplicação de ΔpCO₂ pelo coeficiente de transferência gasosa do CO₂, que depende principalmente do nível de turbulência na interface ar-água (Takahashi *et al.*, 2009). Partindo deste princípio e através da equação (2) foi possível estimar um fluxo líquido oceano-atmosfera (F):

$$F = k \alpha \Delta pCO_2 = Tr \Delta pCO_2 \quad (2)$$

onde k é a velocidade de transferência do CO₂; α é a solubilidade do CO₂ na água do mar; Tr é o coeficiente de transferência gasosa oceano-atmosfera; e ΔpCO₂ é a diferença de pCO₂ no sistema oceano-atmosfera, ajustado ao ano de referência 2000.

O CO₂, tal como outros gases, obedece à Lei de Henry *i.e.* um aumento do nível de CO₂ na atmosfera provoca um aumento da concentração de CO₂ na superfície do oceano (Raven, *et al.*, 2005). Mas se o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera acontece ao ritmo acelerado a que são libertadas as massas de gases produzidas por via antropogenica, impõem-se várias questões: não estará a superfície do oceano a atingir a saturação? Qual é a eficiência do sistema atmosfera-oceano? Poderá o oceano tornar-se fonte de CO₂?

Numa escala global, Takahashi *et al.* (2009) apresentam uma síntese climatológica global actualizada com cerca de três milhões de medições de pCO₂ à superfície do oceano desde 1970 (Doney *et al.*, 2009a) até 2007, que esclarece o actual desempenho dos oceanos. A partir destas medições Takahashi *et al.* (2009) mostram um mapa que sumariza a distribuição global do fluxo anual de CO₂ no sistema ar-água (fig. 1.5), onde as zonas a azul e roxo correspondem às áreas de maior absorção de CO₂ *versus* as zonas a amarelo e vermelho que correspondem a áreas de emissão de CO₂. Em quase todas as regiões são encontrados aumentos de pCO₂ à mesma taxa que na atmosfera. Excepções incluem o oceano Pacífico Norte (Mar de Bering, entre a Sibéria e o Alasca), onde pCO₂ tem um aumento mais lento que na atmosfera, e o Oceano Antártico, onde pCO₂ aumenta a uma taxa relativamente mais rápida que na atmosfera (Doney *et al.*, 2009a).

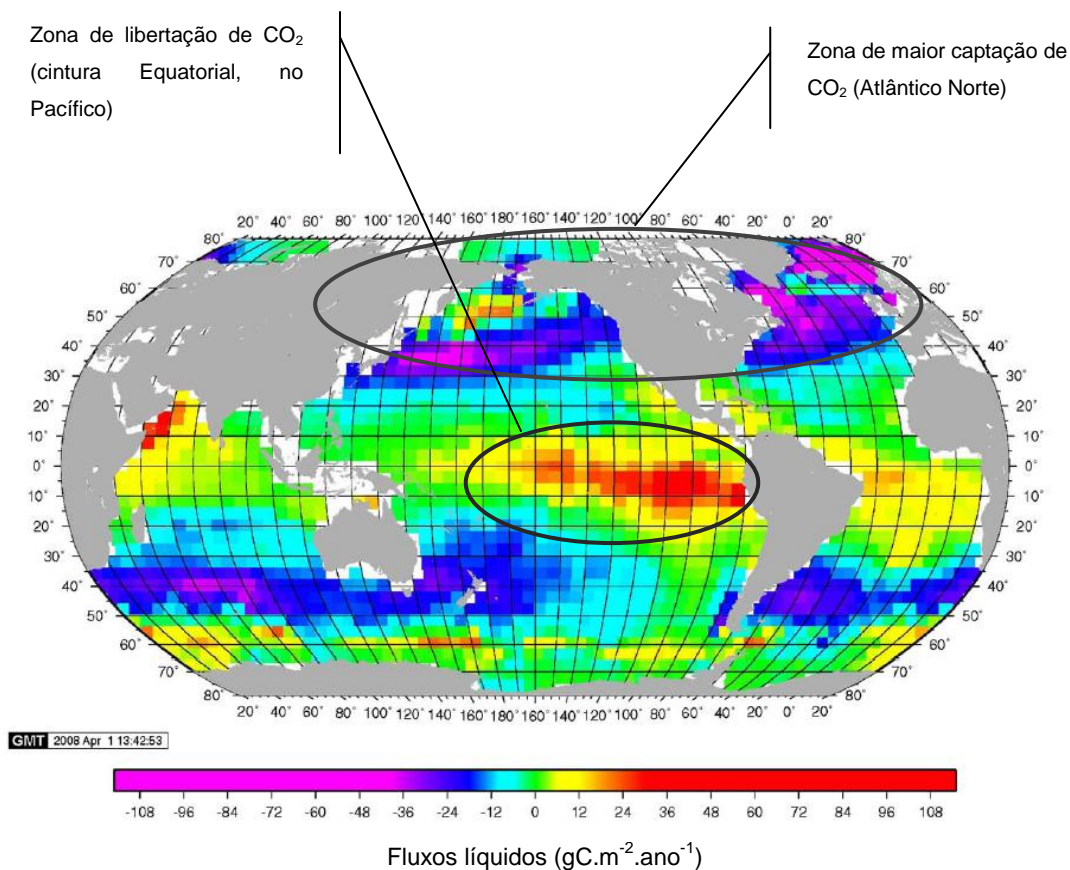


Figura 1.5 Média anual para o fluxo de CO₂ no sistema ar-água, em águas superficiais (condições de não-El Niño) (Takahashi *et al.*, 2009).

Tendo em conta alterações sazonais, como a temperatura da água, utilização biológica do CO₂ e mistura da água assim como alterações na velocidade do vento a melhor estimativa para a média anual do fluxo de captação líquida de CO₂ sobre os oceanos mundiais está estimada em $-1,42 \text{ PgC.ano}^{-1}$ (Takahashi *et al.*, 2009). No entanto salvaguardando certos erros de estimativa e algumas incertezas associadas a $\Delta p\text{CO}_2$, factores de dimensionamento, sub-amostragem, velocidades de vento e métodos de interpolação o valor que se considera é $-1,6 \pm 0,9 \text{ PgC.ano}^{-1}$. Tendo por base o fluxo estacionário, pré-industrial de $0,4 \pm 0,2 \text{ PgC.ano}^{-1}$, estima-se que o fluxo total de absorção de CO₂ antropogénico terá sido de $-2,0 \pm 0,7 \text{ PgC.ano}^{-1}$, para o ano de referência de 2000 (Takahashi *et al.*, 2009). A tabela 2.1 descreve com mais detalhe o fluxo oceano-atmosfera do CO₂ em várias zonas do globo. Os valores positivos indicam fluxos oceano-para-atmosfera e os valores negativos indicam fluxos atmosfera-para-oceano.

Tabela 1.1 Média anual do fluxo de CO₂ no sistema ar-água, em águas superficiais (PgC. ano⁻¹) nas quatro principais bacias oceânicas para a referência do ano 2000 baseado em 3,0 milhões de medições de pCO₂ (Takahashi *et al.*, 2009).

Zona	Área (10 ¹⁶ km ²)	Fluxo de CO ₂ oceano-atmosfera (PgC.ano ⁻¹)				
		Atlântico	Pacífico	Índico	Antártico	Somatório
N de 50°N	16,2	-0,27	-0,03	-	-	-0,3
50-14°N	69,1	-0,22	-0,5	0,02	-	-0,7
14°N-14°S	86,7	0,1	0,48	0,1	-	0,69
14-50°S	109,6	-0,2	-0,41	-0,44	-	-1,05
50-62°S	29,7	-	-	-	-0,06	-0,06
S de 62°S	15,3	-	-	-	0,01	0,01
Bacia oceânica/ oceano global		-0,58	-0,46	-0,32	-0,05	-1,42
% de fluxo		41%	32%	23%	4%	100%
Área Total (10 ¹⁶ km ²)	326,5	74,8	153,8	53	44,9	
% da área	100	23	47	16	14	

A zona com maior captação de CO₂ situa-se no Atlântico Norte. Esta área tem, ainda, um maior potencial de penetração de carbono a maiores profundidades quando comparada com outras bacias oceânicas dado às seguintes combinações: a) superfície altamente alcalina que favorece a absorção de CO₂ e b) trocas verticais mais activas devido à intensa mistura de águas no Inverno (Sabine *et al.*, 2004; Bindoff *et al.*, 2007).

Apesar de existirem zonas no oceano cuja captação de CO₂ é muito baixa ou praticamente inexistente, ainda assim é possível estimar uma média global de fluxo de carbono negativa o que certifica um carácter sumidouro aos oceanos e garante que este recurso é um mecanismo de combate ao excesso de CO₂ na atmosfera.

Prejuízos directos incluem o impacto do aumento da concentração de CO₂ e a acidez, que poderá afectar vários estágios do ciclo de vida dos organismos marinhos. Prejuízos indirectos incluem o impacto resultante de alterações na disponibilidade ou na composição de nutrientes resultado do aumento de acidez (Raven *et al.*, 2005).

1.1.2 CO₂ nas zonas costeiras e estuarinas

Apesar das margens continentais, consideradas como uma extensão desde a linha costeira até 200m de profundidade, ocuparem apenas 7% do oceano e menos de 0,5% do seu volume, são um elemento fundamental no ciclo biogeoquímico do oceano (Chen e Borges, 2009).

Nos estuários, as emissões de carbono apresentam uma grande variação espacial e temporal, resultante de interações complexas vindas de *inputs* de carbono pelo rio, processos de sedimentação e re-suspensão, processos microbiológicos na água e nos sedimentos e trocas gasosas com a atmosfera (Abril e Borges, 2004). Como são menos profundos, menos salinos e menos alcalinos (Wong, 1979; Miller *et al.*, 2009), os habitats estuarinos e costeiros estão mais susceptíveis a alterações no seu pH do que no oceano aberto (Miller *et al.*, 2009). O pH em estuários varia entre 7,0-7,5 em zonas de água doce e entre 8,0-8,6 em zonas de água salgada (EPA, 2006). No entanto, é importante ter em conta que a variabilidade real poderá ser bastante mais elevada.

Chen e Borges (2009), realizaram uma síntese global de medições de pCO₂ onde se verifica que a maioria das plataformas continentais a latitudes altas e temperadas estão sub-saturadas em relação a CO₂ atmosférico durante todo o ano, contudo as plataformas a baixas latitudes parecem estar sobre-saturadas. Por outro lado, a maioria dos estuários e das zonas costeiras adjacentes estão sobre-saturadas em relação ao CO₂ atmosférico. O dimensionamento dos fluxos ar-água de CO₂ baseados em medições de pCO₂ e em cálculos de balanço de massa de carbono indicam que as plataformas continentais absorvem CO₂ atmosférico variando entre -0,33 e -0,36 PgCano⁻¹, correspondendo a um sumidouro de carbono de cerca de 27 a 30% do CO₂ captado em oceano aberto, tendo em conta os mais recentes estudos por Takahashi *et al.* (2009) (Chen e Borges, 2009). Estuários, sapais e mangais emitem cerca de 0,50 PgCano⁻¹, apesar das incertezas associadas a este valor. Ao nível europeu, Borges *et al.* (2006) concluem que a capacidade de absorção de CO₂ das plataformas continentais é altamente significativa e equivalente à capacidade de absorção de CO₂ pela biosfera terrestre, contabilizando uma troca de CO₂ atmosférico de -68,1 TgCano⁻¹ para uma área de 3065x10³ km² de plataforma continental e 67 TgCano⁻¹ para uma área de 112x10³ km² de estuários. A característica sumidoura das plataformas continentais é praticamente equilibrada pela emissão de CO₂ pelos estuários.

Em Portugal, os dados reunidos por Chen e Borges (2009) correspondem a um fluxo de CO₂ no estuário do Douro de -76,0 molCm⁻²ano⁻¹, e no Sado de -31,3 molCm⁻²ano⁻¹ e contabilizando apenas estas duas áreas, Portugal contribui com cerca de 0,22 MtCano⁻¹ (aproximadamente 0,1% das emissões mundiais de CO₂ dos ecossistemas marinhos costeiros) (Oliveira *et al.*, 2011) (fig. 1.6).

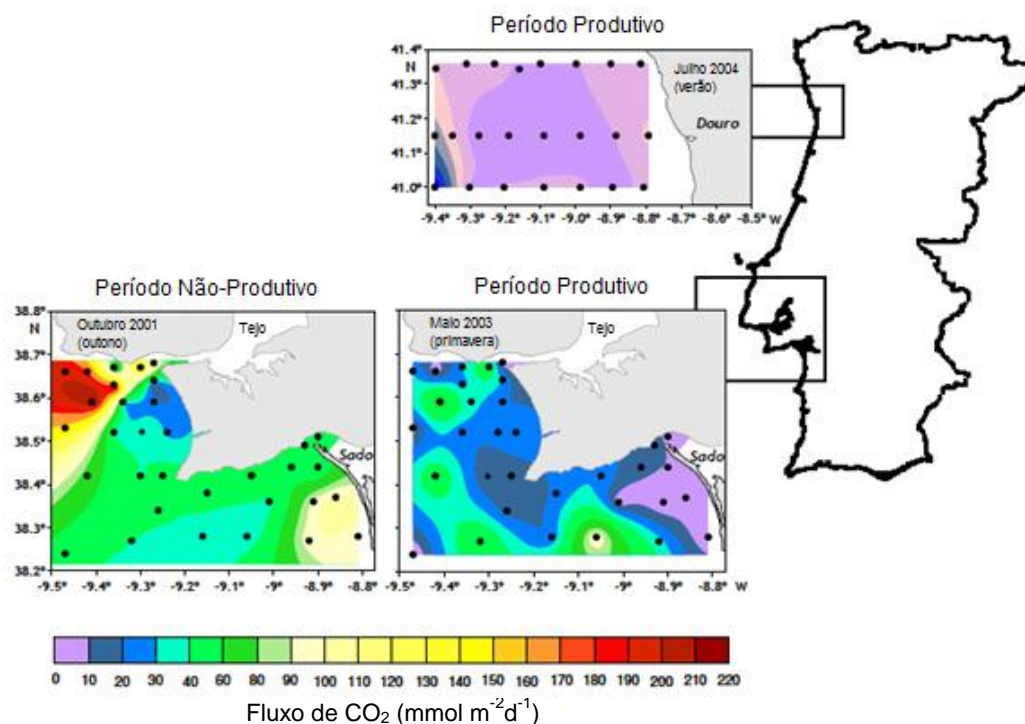


Figura 1.6 Comportamento do fluxo médio diário de CO₂ nos estuários do Douro e Sado (Oliveira *et al.*, 2011)

Nesta figura (1.6) verifica-se que durante o período produtivo (inclui as estações de verão, onde a produtividade primária nas zonas costeiras é mais intensa) o fluxo de CO₂ é mais baixo devido possivelmente a uma elevada concentração de nutrientes à superfície, levando a processos de fotossíntese mais intensos e maior captação de CO₂ dissolvido. É no período não-produtivo que os fluxos mar-ar de CO₂ são maiores, devido a uma contínua descarga de nutrientes no estuário mas dado que as condições de afloramento não são mantidas, nesta altura do ano a libertação de CO₂ para a atmosfera é maior. Extrapolando grosseiramente estes dados por toda a costa portuguesa, pode-se dizer que toda a costa emite CO₂, sendo que a sul se emite mais CO₂ do que a Norte.

Ainda, um estudo realizado por Oliveira *et al.* (2011) para o estuário do Tejo mostra que a variabilidade do fluxo de CO₂ é geralmente positiva como seria de esperar, *i.e.* a libertação de CO₂ é dominante em relação á captação de CO₂ nestas áreas. Curiosamente, esta variação tem vindo a decrescer ao longo dos anos chegando mesmo a valores negativos em 2007 (fig. 1.7). Pensa-se que a colocação de novas ETARs na área do estuário e mesmo a montante conduzirá a uma melhor qualidade da água que entra no estuário (Oliveira *et al.*, 2011).

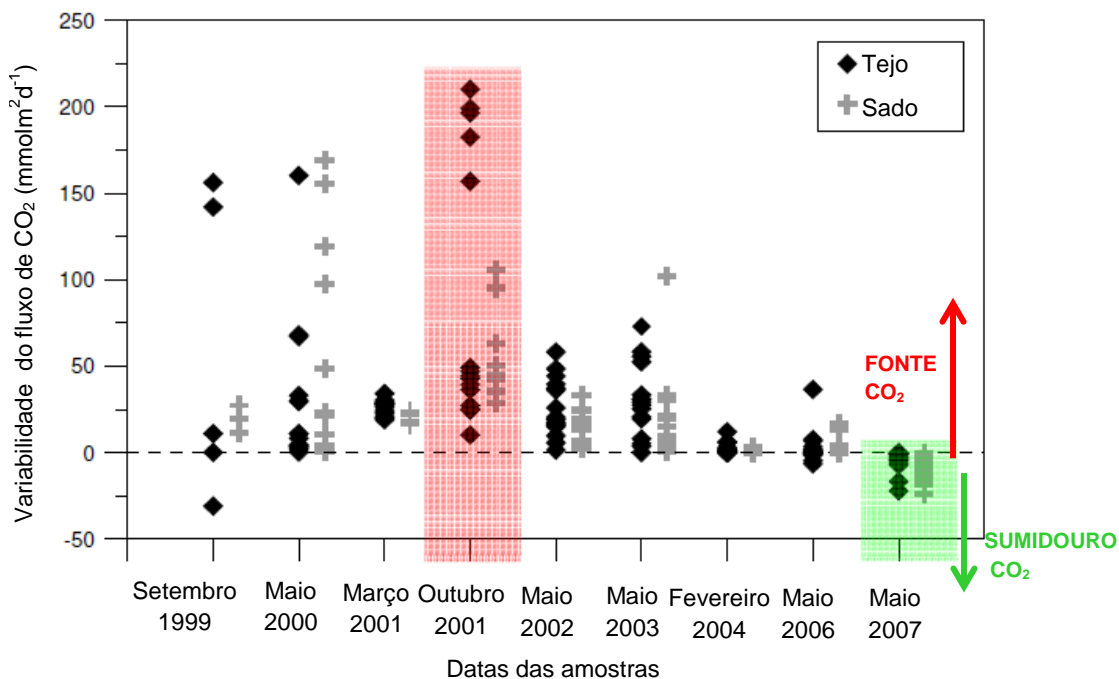


Figura 1.7 Variação do fluxo de CO₂ nos estuários do Sado e Tejo, entre 1999 e 2007 (Oliveira *et al.*, 2011).

A emissão de CO₂ em zonas costeiras é um processo natural dado a natureza das descargas, influência do afloramento e o tempo de residência das descargas nos estuários pode ser maior ou menor. Os estuários e sapais são áreas onde a influência antropogénica pode ser muito grande e o seu equilíbrio pode ser alterado de várias formas (diminuição do pH, aumento da temperatura, menor salinidade, etc.). Ainda assim, globalmente, as zonas costeiras demonstram um potencial de absorção de carbono atmosférico. A plataforma continental adjacente a Portugal apresenta ainda alguma capacidade de absorção de CO₂, mas a emissão de CO₂ nas zonas costeiras interiores pode criar um desequilíbrio no ciclo do carbono (Chen e Borges, 2009).

1.1.3 Consequências da acidificação dos oceanos

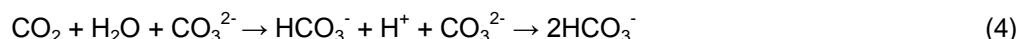
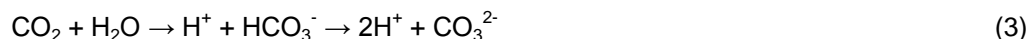
Na atmosfera, o CO₂ é um gás quimicamente inerte mas quando é dissolvido em água do mar, torna-se mais reactivo e participa em diversas reacções químicas, físicas, biológicas e geológicas, muitas delas extremamente complexas (Raven *et al.*, 2005). O ciclo de carbono inorgânico (CID) no oceano é um dos mais importantes equilíbrios químicos marinhos e é responsável pelo controlo do pH na água do mar. Dada a natureza alcalina da superfície oceânica, a água do mar é capaz de absorver grandes quantidades de CO₂ da atmosfera através de processos inorgânicos (Denman *et al.*, 2007).

O pH é uma medida de acidez caracterizada essencialmente por uma escala de concentração de iões H⁺ e é dado por,

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

quanto maior for a concentração de iões H^+ menor é o valor de pH e mais ácida será a solução.

A hidrólise do CO_2 no meio marinho segue uma série de reacções que transformam o CO_2 em bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato, (CO_3^{2-}) (equação 3) (colectivamente conhecidos como CID) (fig. 1.8), encontrados num rácio $CO_2: HCO_3^-: CO_3^{2-}$ de 1:100:10 (Denman *et al.*, 2007),



Uma vez dissolvido na água do mar, o CO_2 reage com água para formar ácido carbónico (H_2CO_3), ácido fraco que permanece no oceano sob uma percentagem inferior a 0,3% (Zeebe, 2009), mas que rapidamente se dissocia em H^+ e HCO_3^- (Doney *et al.*, 2009b) (equação 3). Ficam ainda alguns iões H^+ que reagem com o CO_3^{2-} para formar bicarbonato (HCO_3^-) (Denman *et al.*, 2007) (equação 4). Em suma, o acréscimo de CO_2 na água do mar aumenta as concentrações de H_2CO_3 , HCO_3^- e H^+ e diminui a concentração de CO_3^{2-} e o pH. Estas reacções são reversíveis e a termodinâmica destas reacções em meio marinho é bem conhecida (Millero *et al.*, 2002; Fabry *et al.*, 2004). No entanto, Gattuso *et al.* (2009) afirmam que a acidificação dos oceanos continua a partir de um cenário de emissão *business-as-usual* tal como está a ser realizado no séc.XXI é irreversível à escala temporal humana.

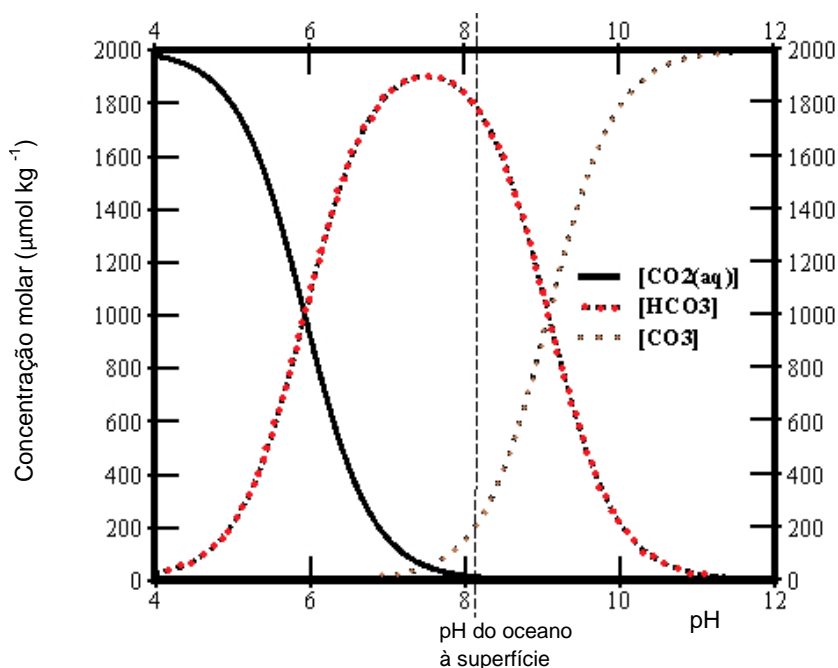


Figura 1.8 Diagrama das três formas de CID, em meio aquoso (Tyrell, 2011)

A superfície do oceano tem um intervalo de pH de 7,9 a 8,3 (Bindoff *et al.*, 2007), que em média se pode dizer que é alcalino. Se a superfície do oceano tiver um $pH \approx 8,1$ então cerca de 90% do carbono inorgânico está sob a forma de iões bicarbonato, 9% são iões carbonato e 1% é CO_2 dissolvido (Doney *et al.*, 2009b). Segundo Bindoff *et al.* (2007), um decréscimo de 0,1 unidades no pH dos oceanos corresponde a um aumento de 30% da concentração de H^+ na água do mar.

A libertação de iões H^+ faz com que os iões carbonato reajam com o hidrogénio para formar iões bicarbonato gerando um efeito “*tampão carbonato*”, mantendo os padrões ligeiramente alcalinos dos oceanos. Mas à medida que a dissolução de CO_2 é mais intensa, a concentração de CO_3^{2-} vai diminuindo e proporcionalmente as concentrações de H^+ e HCO_3^- vão permanecendo na água do mar tornando-a menos básica (Denman *et al.*, 2007), diminuindo a capacidade tampão dos oceanos (consequentemente suprimindo a absorção adicional de CO_2) e dando lugar ao fenómeno de acidificação do oceano. Dois efeitos são esperados:

- a. A produção biológica de corais assim como a produção do fito- e zooplâncton calcificadores na coluna de água pode ser inibida ou retardada (Raven *et al.*, 2005; Denman *et al.*, 2007) e,
- b. A dissolução de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) no fundo do oceano será acrescida (Archer, 2005; Denman *et al.*, 2007).

Porque o CO_2 é absorvido à superfície, a superfície oceânica é a zona primordialmente afectada (Raven *et al.*, 2005). Dado que a escala temporal de alteração do pH à superfície é menor do que a escala temporal das misturas verticais oceânicas, a interacção com sedimentos ricos em $CaCO_3$ é mais lenta e a tendência para activar a capacidade tampão adicional dos oceanos poderá não ocorrer num período de tempo suficiente para diminuir as alterações de pH, *e.g.* se os oceanos de tornarem mais ácidos em profundidade alguns iões carbonatos serão dissolvidos dos sedimentos e suavizarão as alterações de pH. Mas porque as misturas verticais nos oceanos poderão levar dezenas de milhares de anos, existirá sempre um atraso na compensação do pH que poderá nunca se verificar à superfície. Como resultado do aquecimento global, o aumento da temperatura nos oceanos poderá reduzir a taxa de mistura das águas mais profundas, retardando ainda mais esta compensação (Raven *et al.*, 2005).

Caldeira e Wickett (2003) estimaram a variação do pH em profundidade no oceano, desde o início da revolução industrial até ao ano 3000 (fig. 1.9). Prevê-se que esta queda de -0,3 ou -0,4 unidades de pH à superfície para o final do séc. XXI seja equivalente a um aumento aproximado de 150% de $[H^+]$ e um decréscimo de 50% de $[CO_3^{2-}]$ (Orr *et al.*, 2005; Doney *et al.*, 2009b).

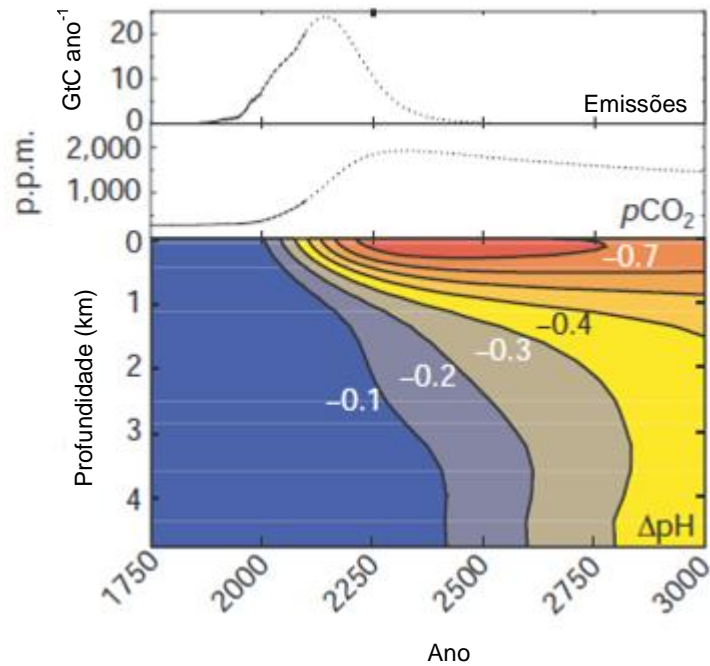


Figura 1.9 Emissões antropogénicas de CO₂, níveis históricos de CO₂ atmosférico e previsão das concentrações de CO₂ a partir do cenário de emissões IS92a, juntamente com alterações no pH de acordo com a química horizontal média (Caldeira e Wickett, 2003).

A disponibilidade de carbonatos é importante para controlar a quantidade de CO₂ que o oceano consegue captar mas também porque muitos organismos marinhos, sobretudo plâncton, corais, moluscos, equinodermes e crustáceos dependem da segregação de calcite, aragonite e dolomite (estruturas minerais à base de CaCO₃) para a formação de conchas e esqueletos calcários (Bindoff *et al.*, 2007). A formação e dissolução mineral pode ser representada da seguinte forma (Raven *et al.*, 2005):



Em ambientes pelágicos, os carbonatos viajam pela coluna de água e poderão ser dissolvidos ou depositados em sedimentos superficiais ou em profundidade (Berelson *et al.* 2007, Feely *et al.* 2004; Doney *et al.*, 2009b). A presença do CO₂ na coluna de água favorece a dissolução do CaCO₃ e compromete o estado de saturação (Ω) das espécies carbonatadas mais comuns, aragonite (Ω_{ARG}) e calcite (Ω_{CAL}),

$$\Omega_{\text{ARG}} = [\text{CO}_3^{2-}] [\text{Ca}^{2+}] / K'_{\text{sparg}}$$

$$\Omega_{\text{CAL}} = [\text{CO}_3^{2-}] [\text{Ca}^{2+}] / K'_{\text{spcal}}$$

onde K'_{sp} corresponde ao produto de solubilidade estequiométrico associado às condições de temperatura, salinidade e pressão. Valores de Ω_{ARG} e $\Omega_{CAL} > 1$ (sobre-saturação de aragonite e calcite) favorecem a formação de estruturas calcárias enquanto que valores < 1 a água do mar torna-se corrosiva para o $CaCO_3$ e dá início à sua dissolução (sub-saturação). Os estados de saturação são geralmente mais elevados nos trópicos e mais baixos em latitudes inferiores, porque a solubilidade do $CaCO_3$ aumenta com o decréscimo da temperatura e aumento da pressão (Fabry *et al.*, 2008).

O nível ao qual a aragonite e a calcite estão em equilíbrio termodinâmico ($\Omega=1$) é chamado o horizonte de saturação ou profundidade de saturação. Este horizonte é significativamente menos profundo para a aragonite do que para a calcite, uma vez que aragonite é aproximadamente 50% mais solúvel em água do que a calcite (Mucci, 1983; Doney *et al.*, 2009b). Uma vez que o rácio cálcio-salinidade na água do mar não varia mais do que 1,5%, as variações no rácio $[CO_3^{2-}]:K'_{sp}$ dominam o grau de saturação em relação à aragonite e calcite. A comparação entre horizontes de saturação pré-industriais e horizontes de saturação actuais revela uma grave distinção entre regiões cujo nível de sub-saturação foi ampliado (Feely *et al.*, 2004).

Através do NCAR Climate System Model, Gattuso *et al.* (2009) projectaram, para os dois cenários *business-as-usual* A2 e B1 do IPCC, a concentração de iões carbonato à superfície versus CO_2 atmosférico para três grandes bacias oceânicas: Zona Oceânica Equatorial, Oceano Antártico e Oceano Ártico (fig. 1.10). Neste gráfico é visível que as zonas oceânicas a altas latitudes serão as mais afectadas e que sub-saturação no Ártico é iminente. É nas latitudes mais elevadas que se concentram os corais de água fria que servem de suporte a uma vastíssima biodiversidade (Fabry *et al.*, 2009).

Prevê-se que quando CO_2 atmosférico atingir 780 ppmv no final do século, de acordo com o cenário IS92a, o Ω_{ARG} atinja valores inferiores a 1 e a superfície do Oceano Antártico se torne favorável à dissolução do $CaCO_3$ (Orr *et al.*, 2005) (fig. 1.10) e poderá mesmo atingir níveis irreversíveis (Gangstø *et al.*, 2011). Uma vez que a calcite é menos solúvel que a aragonite e dolomite, prevê-se que a sua sub-saturação à superfície ocorra quando pCO_2 atinja 900 ppmv (Fabry *et al.*, 2009).

Em relação aos impactes biológicos, prevêem-se severas consequências e uma considerável limitação nos invertebrados de vários grupos taxonómicos que dependem de processos de calcificação na sua formação como já foi referido. A grande barreira de coral na Austrália, cuja capacidade de calcificar é altamente dependente do pH, já evidencia níveis de dissolução em paralelo com a diminuição do pH no meio (Wei *et al.*, 2009). Para os níveis de aragonite esperados em 2100, uma espécie de pterópode (*Clio pyramidata*) que habita no Pacífico norte, sub-ártico, mostra indícios de dissolução da concha apenas em 48h (Orr *et al.*, 2005).

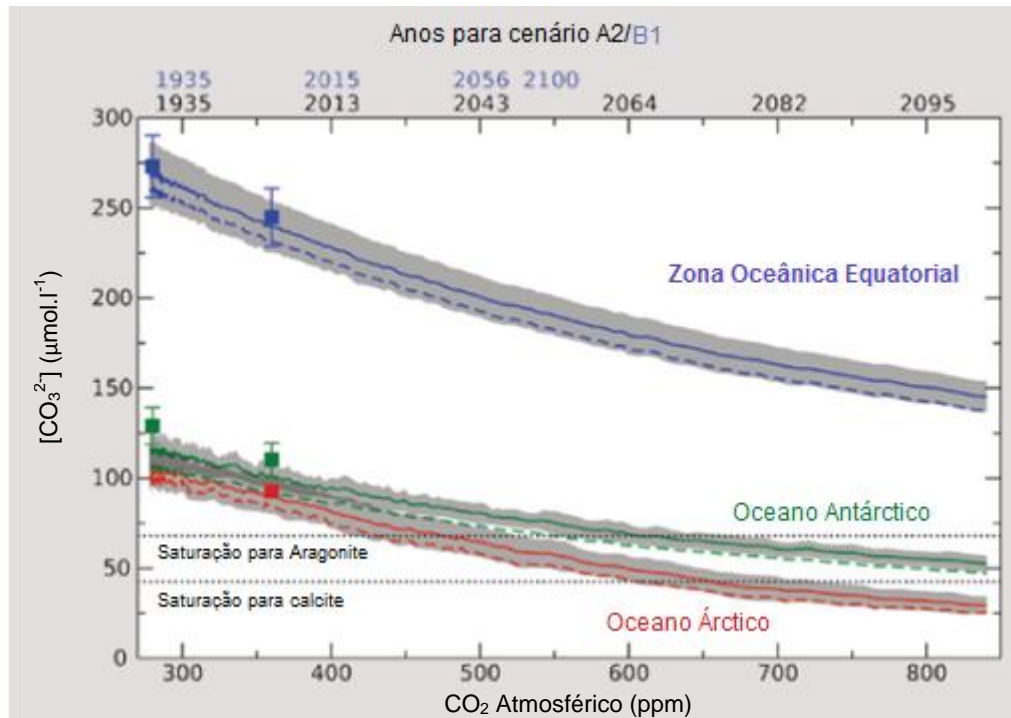


Figura 1.10 Projecção da concentração de CO_3^{2-} versus CO_2 atmosférico até ao ano 2100, de acordo com os cenários A2 e B1 (*business-as-usual*) (Gattuso *et al.*, 2009)

A composição da concha de um molusco adulto é altamente variada e pode ser formada a partir de calcite ou aragonite ou ambos, construída numa ou várias camadas ao qual cada uma poderá ter diferentes ultra-estruturas. Em contraste, todas as conchas de larvas de molusco contêm aragonite e apresentam ultra-estruturas muito semelhantes, senão idênticas (Weiss *et al.*, 2002).

Na última década, foram feitos vários estudos com variados organismos marinhos que produzem estas espécies carbonatadas durante o seu desenvolvimento no sentido de melhor compreender o seu comportamento perante um meio acidificado e consequentemente saturado para a aragonite e a calcite. Gazeau *et al.* (2010) mostram um efeito significativo da acidificação dos oceanos no desenvolvimento larvar do mexilhão (*Mytilus edulis*) com decréscimo nas taxas de crescimento em termos de comprimento e espessura. Em concordância, estudos feitos em indivíduos adultos não demonstram impactes a curto-prazo, a nível histológico, mas em contra-partida o crescimento será comprometido perante exposições a longo-prazo (e.g. Beesley *et al.*, 2008). Michaelidis *et al.* (2005) revelam que a hipercapnia causou uma desaceleração do crescimento do mexilhão adulto *Mytilus galloprovincialis*, possivelmente relacionadas com a redução da taxa metabólica e da dissolução das conchas de CaCO_3 como resultado da acidose extracelular e afirmam ainda que um pH inferior a 7,5 na água do mar é prejudicial para moluscos com concha. Kuroyanagi *et al.* (2009) apresentam uma diminuição do diâmetro máximo do foraminífero, *Marginopora kudakajimensis*, quando sujeito a um pH de 8,2 e 7,9 e um decréscimo da taxa de calcificação quando sujeito a pH 7,7. Dupont *et al.* (2008) concluem que a taxa de mortalidade larvar do ofiurídeo *Ophiothrix fragilis* foi grandemente afectada perante um pH de 7,7 e 7,9 em apenas 8 dias.

Recentemente, viveiros comerciais de ostras na costa oeste dos Estados Unidos da América, relatam dificuldades em manter as culturas de larvas de *C. gigas*, mostrando decréscimos de produção em cerca de 80% (Miller *et al.*, 2009).

Estas alterações na química dos oceanos dão início a uma série de grandes desafios aos ecossistemas marinhos. Apesar de ainda haver algumas lacunas no conhecimento da influência dos elementos físico-químicos no controlo biológico, metabolismo e fisiologia marinhos sob diferentes estados de saturação (Atkinson e Cuet, 2008) é possível prever que as variações em recifes de coral de água quente ou água fria e mesmo modificações no ciclo do carbono nas grandes bacias oceânicas terão ramificações a grande escala (Raven *et al.*, 2005). Este fenómeno é significativo não só para a estabilidade ecológica deste tipo de organismos mas também para o seu papel no ciclo global do carbono. Tanto nos moluscos, como nos corais e equinodermes, os impactes sub-letais da acidificação dos oceanos na produção de ovos, no sucesso da fecundação, no desenvolvimento larvar, na dinâmica da larva e alimentação, no sucesso do assentamento, metamorfose e sobrevivência pós-metamorfose irão influenciar a aptidão e a resiliência das populações marinhas (Dupont *et al.*, 2008).

1.2 Enquadramento

A exploração não sustentável dos recursos marinhos tem provocado danos possivelmente irreversíveis em algumas zonas dos oceanos. A pesca excessiva e ilegal, as descargas de poluentes, a formação da “ilha de lixo” no giro do Pacífico Norte e a contaminação com microplásticos são vários exemplos de exploração e destruição de um dos recursos mais ricos e diversificados do planeta. A acidificação dos oceanos é mais um exemplo e a juntar aos restantes poderá contribuir para um desequilíbrio físico-químico que conduzirá estes recursos a um estado de desgaste extremo, de difícil recuperação.

Para além de os oceanos contribuírem activamente para a regulação e equilíbrio do planeta são também uma fonte inesgotável de informação, uma vez que a vida nos oceanos é mais antiga do que a vida em terra. E é importante salientar o valor da biodiversidade enquanto recurso natural que permite a sobrevivência e expansão humana. Independentemente de qualquer consideração directamente económica ou prática, há razões puramente morais para preconizar uma sabedoria conservacionista: a primeira é, naturalmente, respeitar os direitos de outrem (Barbault, 1994).

Contabilizam-se cerca de 230 000 espécies de animais e plantas marinhas cientificamente descritas, das quais 200 000 espécies pertencem ao domínio bêntico (Heip, 2007). Desta vasta gama de espécies bentónicas a maioria são corais e apenas 60 000 espécies vivem na zona intertidal (Heip, 2007). Este elevado número de espécies representa apenas uma pequena fracção do que se estima ser o total de espécies existentes. Para além desta elevada diversidade biológica, os oceanos apresentam-se também como fornecedores de bens, como alimentos ou compostos para biotecnologia e para a indústria farmacêutica, e serviços, como a mineralização de materiais orgânicos, armazenamento de carbono, sequestro de poluentes e descargas

orgânicas entre outros (Heip, 2007). É um meio complexo e fascinante e claramente à mercê de futuros compromissos por parte do Homem.

A diversidade biológica surge como algo complexo e dinâmico que urge proteger e é por isso que esta é a altura de mudar e criar plataformas de investigação, acção e protecção deste bem, que é de todos. E por isso, nesta última década a acidificação dos oceanos tem sido, e ainda é hoje em dia, um tema amplamente discutido na comunidade científica. Associado a várias questões pertinentes, a grande parte está focada nas consequências dos efeitos da acidificação em organismos bentónicos calcificadores, dada a sua importância ecológica. No sentido de contribuir para o conhecimento desta matéria, este trabalho examina os efeitos da acidificação no desenvolvimento larvar de uma espécie bivalve com elevado valor comercial a nível mundial, a ostra (*Crassostrea gigas*) considerando os vários cenários previstos pelo IPCC.

Há várias décadas que, para a comunidade científica, a palavra “dióxido de carbono” aparece inevitavelmente associada às “alterações climáticas”, sendo sem dúvida um dos temas de grande peso no domínio das preocupações públicas.

No sentido de perceber a evolução do CO₂ na atmosfera, em 1958, Charles D. Keeling deu início a um dos maiores projectos de medição de CO₂ atmosférico (Scripps CO₂ Programme, 2011). Reunindo uma extensa base de dados associada às medições feitas em Mauna Loa, no Havai, estes registos contínuos, sem interrupções desde a década de 50, deram origem à chamada Curva de Keeling (fig. 1.2), que se tornou num símbolo do impacto dos seres humanos no planeta. Através desta curva é, hoje, possível detectar o aumento deste gás na atmosfera.

Em 2001, o *International Geosphere-Biosphere Programme (IGBP) / Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR) Ocean Futures Planning Committee* deu início ao projecto de investigação *Integrated Marine Biogeochemistry and Ecosystem Research (IMBER)*, previamente conhecido como OCEANS, com o objectivo de identificar os principais assuntos científicos relacionando o aspecto químico e biológico dos oceanos nas alterações globais e os efeitos destas alterações nos oceanos (IMBER, 2008).

Em 2003, Caldeira e Wickett relacionaram o aumento de CO₂ atmosférico com a sua dissolução na superfície oceânica e concluíram que a contínua dissolução de CO₂ nos oceanos “podem produzir alterações no pH dos oceanos maiores do que já alguma vez ocorreram nos últimos 300 milhões de anos, com a possível excepção de eventos raros e catastróficos na história da Terra”. Após este estudo, a acidificação dos oceanos teve um claro reconhecimento científico por vários sectores da comunidade científica internacional dando assim lugar ao primeiro simpósio internacional da UNESCO, “The Ocean in a High CO₂ World”, em Maio de 2004 patrocinado pela SCOR e pela IOC-UNESCO. Este simpósio teve o objectivo de reunir vários especialistas no domínio marinho para discutir as prováveis consequências da absorção passiva de CO₂ pelos oceanos em comparação com as potenciais consequências associadas às actividades de sequestro de carbono no oceano. O *Journal of Geophysical Research* (2005, Vol.110) publicou um

conjunto de artigos numa secção especial, *Oceans*, dando assim destaque aos resultados significativos que foram apresentados neste colóquio. Outro produto deste simpósio foi a contribuição dos artigos publicados para o *Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC) no seu relatório sobre captura e armazenamento de CO₂. Citando Goldston na revista *Nature* em 2008, este simpósio foi “o ponto de viragem na ampliação da consciencialização dos cientistas sobre a acidificação”.

Em 2005, a academia *The Royal Society* reuniu um grupo de cientistas especialistas em ciências da terra e ciências marinhas e publicou um estudo bastante conciso que fornece toda a informação disponível, até então, sobre a acidificação dos oceanos e os seus prováveis impactes nos organismos marinhos (Raven *et al.*, 2005).

Após o sucesso do primeiro simpósio foi definido pelas entidades organizadoras manter a realização deste evento de quatro em quatro anos. Foi então em 2008, no Mónaco, que o segundo simpósio teve lugar, mais uma vez patrocinado pela SCOR e IOC-UNESCO e ainda pela *International Atomic Energy Agency's Marine Environment Laboratories* e pelo *International Geosphere-Biosphere Programme*. Neste simpósio foi redigido um documento intitulado *The Monaco Declaration*, aprovado por 155 líderes de investigação na acidificação dos oceanos, que apela aos “principais cientistas de todo o mundo acções imediatas para travar a acidificação dos oceanos” in Comunicado de imprensa a 30 de Janeiro de 2009 pela UNESCO, disponível em «<http://www.ocean-acidification.net/>».

Em 2009 o IMBER, juntamente com o *Surface Ocean Lower Atmosphere Study* (SOLAS), organizou o *Carbon Research Working Group* um grupo de trabalho dedicado sobretudo a inventários, fluxos e transporte de carbono e à sensibilidade dos processos ambientais associados às mudanças que ocorrem no oceano (IMBER, 2010).

Toda a informação associada a esta série de simpósios está disponível na plataforma online *Ocean Acidification Network*, em www.ocean-acidification.net, onde também se pode encontrar a direcção para os sítios *European Project on Ocean Acidification* (EPOCA) e para o *Carbon Research Working Group*. Para além desta plataforma online, existem ainda vários sítios online onde é possível descobrir os últimos estudos e ensaios experimentais (IMBER, 2010):

- EPOCA *Ocean Acidification* blogue: <http://oceanacidification.wordpress.com/>

Um consórcio de investigadores europeus que examinam o progresso da acidificação dos oceanos e o seu efeito na vida marinha. O seu trabalho é usado no desenvolvimento de ferramentas educacionais para as partes interessadas.

- *Integrated Marine Biogeochemistry and Ecosystem Research* (IMBER) / *Surface Ocean Lower Atmosphere Study* (SOLAS) *Joint Carbon Research Working Group*: http://www.imber.info/C_WG.html

Grupo de trabalho internacional cujo trabalho de investigação foca sobretudo nos fluxos, transporte e inventários de carbono e na sensibilidade dos processos oceânicos onde a alteração de carbono é relevante.

- *Mediterranean Sea Acidification in a changing climate* (MedSeA): <http://medsea-project.eu/>

Iniciativa europeia que avalia incertezas, riscos e limites da acidificação do Mediterrâneo à escala dos organismos e ecossistemas mas também à escala económica. Promove o diálogo e apresenta medidas políticas de mitigação e adaptação.

- *Ocean Carbon and Biogeochemistry – Ocean Acidification* (OCB-OA): <http://www.whoi.edu/OCB-OA/page.do?pid=32356>

Um subcomité cujo objectivo é promover, planear e coordenar a colaboração de vários investigadores e oportunidades de pesquisa multidisciplinar relacionada com a acidificação dos oceanos.

- *UK Ocean Acidification Research Programme*: <http://www.oceanacidification.org.uk/>

Grupo de trabalho assente no Reino Unido que pretende reduzir as incertezas nas previsões da alteração química dos carbonatos e o seu efeito nos ecossistemas, assim como fornecer informação aos decisores.

Em Setembro de 2012, está já agendado o terceiro simpósio da série “*The Ocean in a High CO₂ World*” em Monterey, Califórnia.

1.3 Objectivos

Este trabalho teve por objectivo compreender a influência do aumento do carbono antropogénico no ecossistema marinho, em particular na sobrevivência, desenvolvimento e formação da concha em larvas de ostra japonesa (*Crassostrea gigas*). Foram desenvolvidos dois ensaios experimentais em laboratório visando:

- Analisar de que forma o aumento de CO₂ no meio marinho influencia a viabilidade de *C. gigas*, em particular na taxa de fecundação e eclosão larvar, taxa de mortalidade, taxa de crescimento larvar (comprimento e altura) e ainda malformações durante a embriogénese;
- Avaliar três cenários de pHs diferentes: pH de controlo (8,1), pH reduzido a -0,4 unidades (partindo de um intervalo de -0,3 a -0,5 previsto pelo IPCC, 2007, para o cenário de emissões IS92a até ao final do século XXI) (7,7) e um pH reduzido a -0,7 unidades (estimado por Caldeira e Wickett, 2003, até ao ano 2300) (7,4).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Caracterização da espécie

Os ensaios experimentais realizaram-se com a espécie *C. gigas* (Thunberg, 1793), vulgarmente designada em Portugal por ostra japonesa. É uma espécie caracteristicamente estuarino-lagunar e habita ao longo de toda a costa portuguesa (FAO, 2011). As ostras da família *Crassostrea* têm, normalmente, uma concha mais comprida e menos ampla, com depósitos calcários laminados, divididos em folhas (Héral e Deslous-Paoli, 1991), sendo esta a sua característica mais proeminente. A valva esquerda é curva e a valva direita é plana. As valvas são compostas principalmente por CaCO_3 e possuem três camadas: a camada interna ou nácar, a camada intermédia ou prismática que constitui a maior parte do escudo, e a camada exterior que poderá estar ausente por abrasão ou desgaste, em organismos mais velhos (Helm e Bourne, 2004). Interiormente, a concha é revestida por um manto que envolve a massa visceral e é responsável pela segregação destas camadas sucessivas de carbonato de cálcio.

C. gigas é hermafrodita mas a mudança de sexo ocorre de forma irregular e sazonal e a desova depende sobretudo do aumento da temperatura da água (FAO, 2011) mas factores ambientais como salinidade, luz, fases lunares e marés, também poderão influenciar a desova (Gaspar, 1996). Contudo, esta estratégia de reprodução é muito aleatória dado que a duração de vida dos gâmetas é muito breve sendo por isso necessários mecanismos de sincronização na libertação dos gâmetas pelo macho e pela fêmea e na orientação desses gâmetas em direcção uns dos outros (Gaspar, 1996).

Num período de 24 horas o ovo fecundado passa pelas fases de blástula e gástrula e após 24-36 horas desenvolve-se numa larva trocófora móvel (Helm e Bourne, 2004). É neste estágio que ocorre a segregação e mineralização da primeira concha larvar, através de um grupo especializado de células ectodérmicas (Kniprath, 1979; Iwata, 1980; Weiss *et al.*, 2002). Dá-se a invaginação do grupo de células que compõem a gástrula e as células remanescentes à superfície dão nome ao perióstraco (Eyster e Morse, 1984; Weiss *et al.*, 2002), uma película de material orgânico que reveste a concha permeável a Ca^{2+} e carbono inorgânico, e a parte interior dá origem ao manto (Weiss *et al.*, 2002). Entre o manto e concha surge um fluido extrapalial, que dá origem ao processo de calcificação das camadas da concha (McConnaughey e Gillikin, 2008). Esta fase larvar designa-se de larva velígera, vulgarmente designada por larva "D", devido à sua forma (fig. 2.1), apresentando a primeira concha larvar, a chamada prodissoconcha I (Christo e Absher, 2008), formada sobretudo por depósitos de carbonato de cálcio amorfo (ACC), que são então parcialmente transformados em aragonite (Weiss *et al.*, 2002). O ACC é uma das fases do CaCO_3 pouco estável e bastante mais solúvel que a aragonite. A prodissoconcha I é ampliada até que o embrião seja totalmente envolvido e até ser capaz de fechar as duas valvas (Weiss *et al.*, 2002). A velígera é a forma mais comum de larva em bivalves marinhos. De nado livre e planctónica, a velígera distingue-se pela prodissoconcha translúcida muito frágil, a partir da qual se distingue o manto e o velum (um mecanismo de alimentação e de locomoção) (Zardus e Martel, 2002) (fig.

2.2). O velum é circular e pode-se situar entre as duas valvas. É ciliado ao longo da sua margem externa e permite que a larva se mova, apenas o suficiente para se manter na coluna de água (Helm e Bourne, 2004).

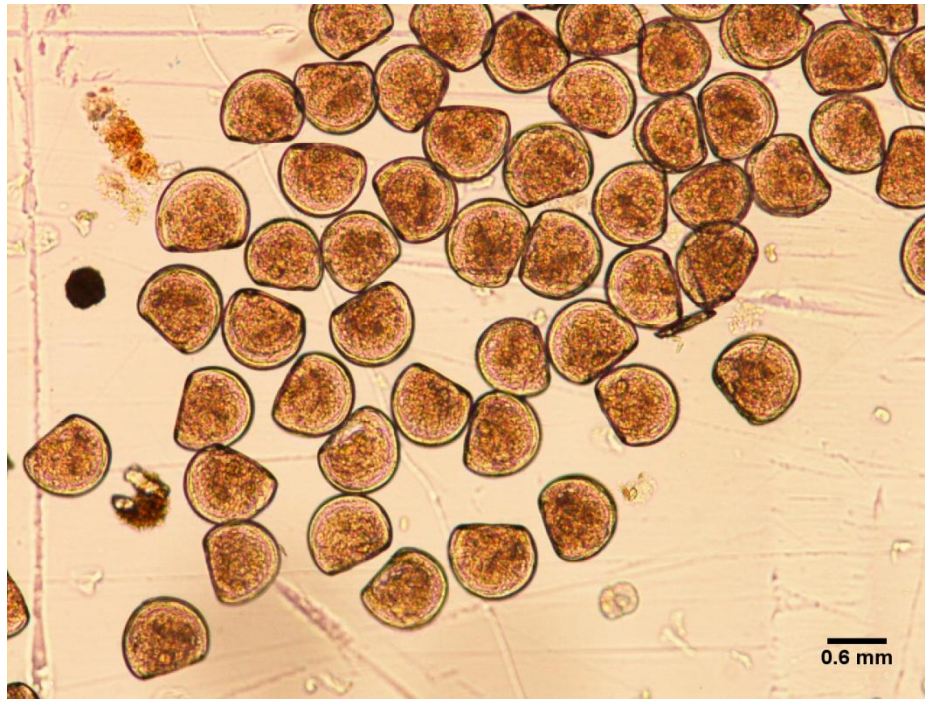


Figura 2.1 Larvas velígeras "D", de *Crassostrea gigas*

À medida que a larva vai atingindo a maturidade, passa para a fase de larva velígera umbolada (fig. 2.2). A fase de desenvolvimento larvar é geralmente uma etapa bastante sensível, uma vez que o sucesso da sobrevivência larvar depende de factores ambientais (temperatura, salinidade, poluição) e biológicos (doenças bacterianas, fungos, parasitas) (FAO, 2011). Assim, uma boa desova nem sempre implica um bom recrutamento dado o inúmero conjunto de factores quer abióticos quer bióticos que condicionam a sobrevivência das larvas e pós-larvas (Gaspar, 1996).

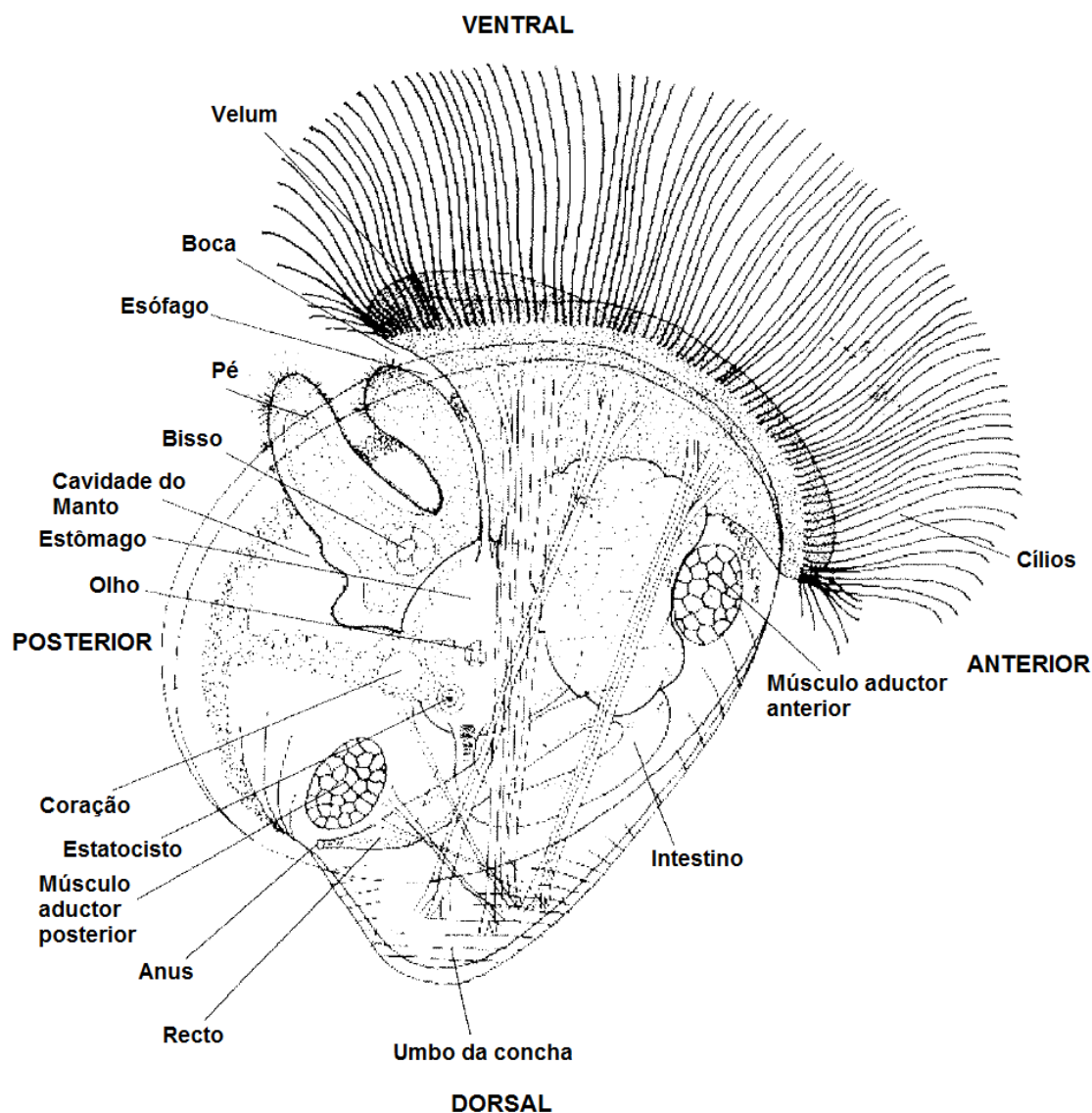


Figura 2.2 Larva velígera umbolada (Zardus e Martel, 2002).

2.2 Procedimento experimental

Os ensaios experimentais foram realizados nas instalações da Estação Experimental de Moluscicultura de Tavira (EEMT) do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INBR, I.P./L-IPIMAR) (37°7'17.73"N, 7°37'12.19"W).

2.2.1 Montagem do circuito de cultura larvar

O circuito utilizado nos ensaios experimentais desta dissertação teve por base o que foi montado para o desenvolvimento do estudo de Range *et al.* (2011) para juvenis de *Ruditapes decussatus*. Contudo, para a prossecução do objectivo proposto, a análise do efeito de acidificação dos oceanos na fecundação e desenvolvimento larvar da ostra japonesa *C. gigas*, foi necessário proceder-se a uma adaptação deste circuito para a realização da cultura larvar.

A EEMT é abastecida com água salgada de furo, que é armazenada num reservatório de decantação em cimento de 200 000L, sendo posteriormente filtrada por um filtro de areia.

De forma a assegurar uma oxigenação adequada e um pH estável durante os ensaios experimentais, a água do mar foi sujeita a arejamento durante 2 - 3 dias em tanque de fibra de vidro antes de ser transferida para três tanques de distribuição (fig. 2.3 e 2.4) de 250L. Estes tanques de distribuição destinam-se a fazer um pré-armazenamento da água do mar, com diferentes valores de pH (Controlo, pH 7,7 e pH 7,4). A água que foi transferida para estes tanques de distribuição foi filtrada por uma sequência de filtros de cartucho (60 μm , 10 μm e 1 μm).

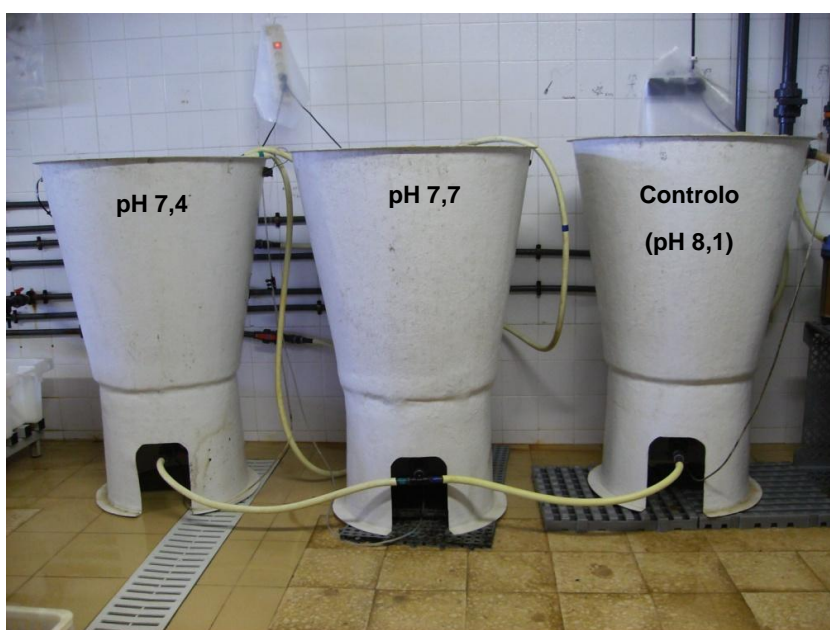


Figura 2.3 Tanques de distribuição (250L); o fluxo de passagem de água ocorre da direita para a esquerda.

Aos tanques de distribuição (pH7,7) e (pH7,4), associou-se um mecanismo de difusão de CO_2 puro, para condicionar o meio aos valores de pH requeridos consoante os objectivos. Esta adição de CO_2 foi feita a partir de dois reactores automáticos fechados que libertam gás na água do mar corrente, consoante a carência deste gás no circuito.

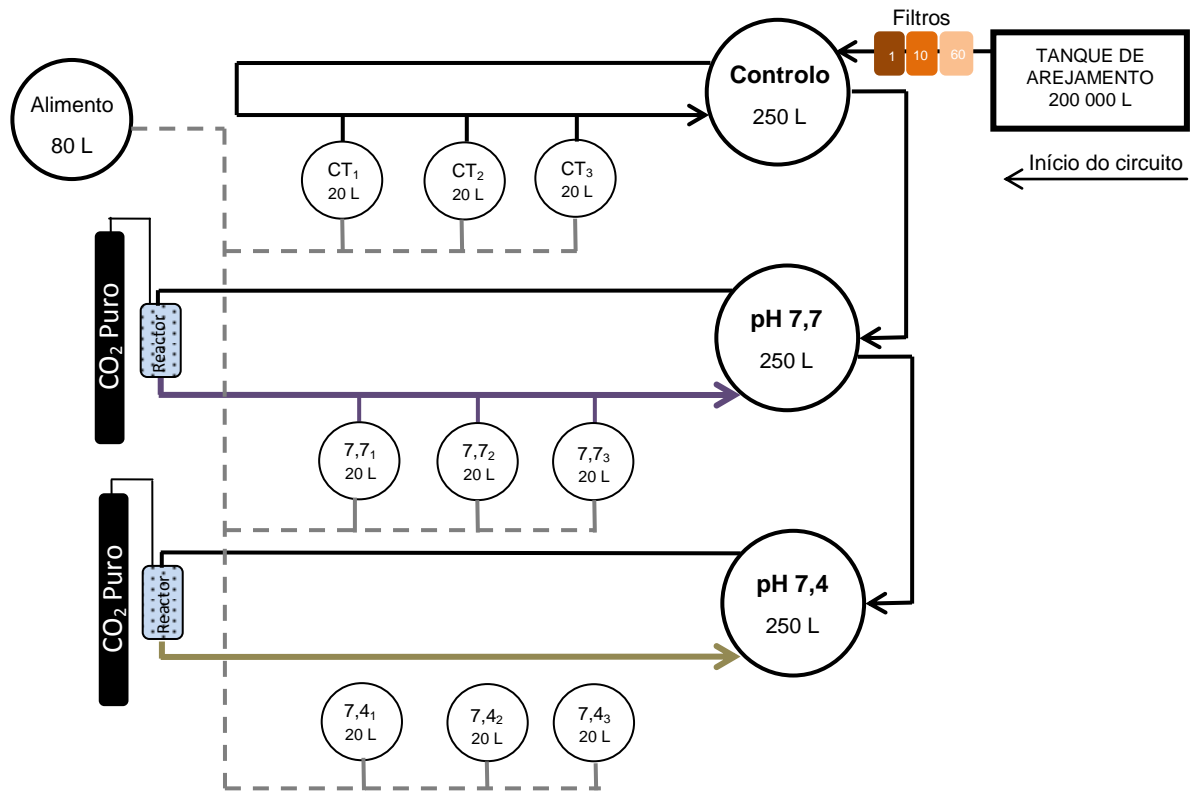


Figura 2.4 Circuito de abastecimento contínuo de água salgada e sistema de difusão de CO₂.

O fluxo de CO₂ foi controlado por um sistema de controlo de pH, Aqua Medic AT-Control, onde previamente foram programados os valores de pH exigidos para cada tanque. Caso o valor de pH nos tanques 7,7 e 7,4 ultrapassasse cerca de $\pm 0,1$ unidades, o sistema iniciaria uma correcção automática de CO₂, até os valores programados voltarem a ser atingidos.

A partir dos tanques de distribuição a água foi distribuída, por meio de tubos de PVC, para nove tanques de cultivo larvar (tanques cilíndrico-cónicos de polietileno branco, com volume de 20L), figura 2.5, alinhados em três séries de três tanques. Toda a água que não saiu para estes tanques de cultivo retornou aos tanques de distribuição. A cada tanque de cultivo larvar estava associado um tubo ladrão para que o sistema de água se mantivesse em contínuo e para que o volume total de água fosse renovado 3-4 vezes por dia, um eléctrodo de medição de pH, um tubo de saída de água, proveniente dos tanques de distribuição, um tubo de alimentação e um filtro feito a partir de um tubo forrado com uma rede de plâncton com uma porosidade de 30 μ m para impedir a saída das larvas com a renovação contínua da água.

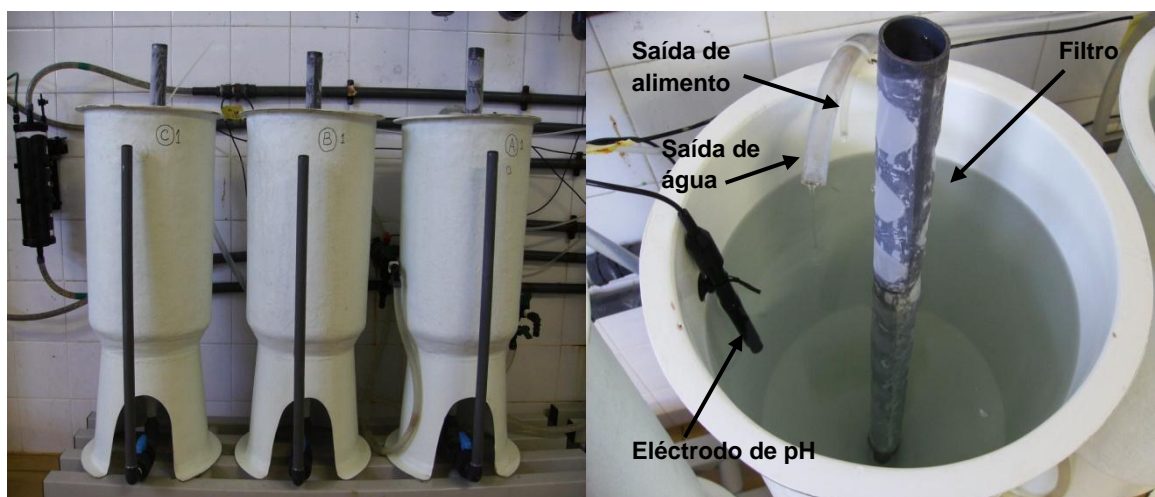


Figura 2.5 Tanques de cultivo larvar (20L), cada com um tubo ladrão associado, um filtro de 30 μ m no interior, um eléctrodo de leitura de pH, um tubo de alimentação e um tubo de saída de água.

Os eléctrodos de pH foram previamente calibrados em soluções de pH de 7,0 e 9,0. O fluxo de saída de água foi controlado diariamente para aproximadamente 9Lh⁻¹ em todos os tanques de cultivo larvar para que todos os tanques estivessem sujeitos às mesmas condições e também para não haver discrepâncias nos valores medidos de pH.

Ao longo dos ensaios desenvolvidos, para além do pH foi também monitorizada a temperatura (°C) e salinidade, através de dois eléctrodos, respectivamente, cujas medições são também controladas e armazenadas pelo programa Aqua Medic AT Control.

2.3 Ensaios Experimentais

Foram efectuados dois ensaios experimentais. O primeiro ensaio experimental assenta sobretudo na obtenção de larvas e a sua colocação em meios acidificados, de forma a analisar o seu desenvolvimento embrionário e larvar. O segundo ensaio experimental visou avaliar o efeito da acidificação na fecundação e desenvolvimento embrionário e larvar.

2.3.1 Efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar de *C. gigas*

A 23 de Março de 2011 foram recolhidas 30 ostras selvagens junto de viveiros de amêijoas, na Ria Formosa, zona de Olhão, acondicionadas e transportadas para o laboratório da EEMT. Devido sobretudo à dificuldade de controlo associada à natureza das desovas espontâneas em laboratório, decidiu-se fazer a recolha destes indivíduos durante a época normal de postura da ostra garantindo, em parte, a maturidade sexual necessária para a obtenção de gâmetas e posterior fertilização.

A análise da maturação e a obtenção dos gâmetas foi feita imediatamente à chegada ao laboratório. Neste caso, tanto a confirmação do estado de maturação sexual dos indivíduos como

a extracção dos gâmetas masculinos e femininos foram feitos a partir do mesmo método – escarificação da gónada.

A escarificação é fundamentalmente um método de remoção directa dos gâmetas maduros, através da dissecação da gónada dos bivalves. É um método comum e conveniente sobretudo quando é necessário ter controlo sobre a fecundação para obtenção de larvas, como é o caso, sendo corrente aplicá-lo a espécies do género *Crassostrea*. No entanto este processo exige o sacrifício de um certo número de bivalves adultos. Depois de reunidos cerca de 30 indivíduos adultos de *C. gigas*, deu-se início ao processo de escarificação individualizando-as para se poder distinguir machos e fêmeas. Com uma faca removeu-se a valva superior da concha para deixar exposto o corpo. A gónada encontra-se junto à valva inferior (fig. 2.6). Posteriormente, fez-se uma incisão na gónada com um bisturi, seguida de uma ligeira pressão para provocar a saída dos gâmetas e fazer um esfregaço para determinar microscopicamente o sexo e o grau de maturação.

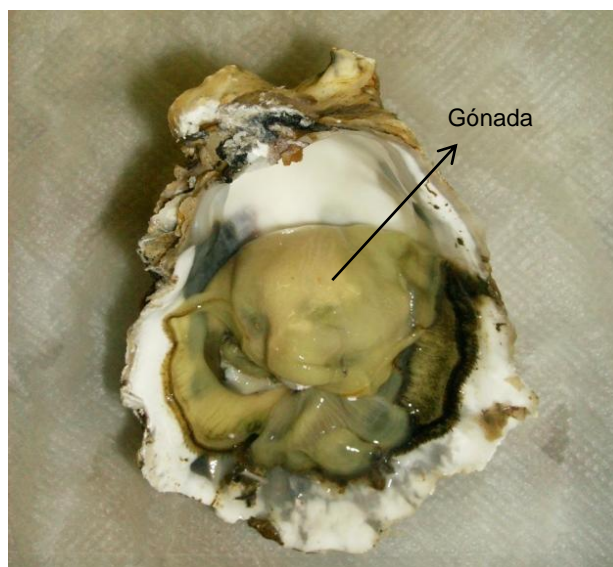


Figura 2.6 *Crassostrea gigas* aberta, com exposição da gónada.

Para que a fecundação ocorra, o esperma deve apresentar mobilidade e os ovócitos, que possuem forma de “pêra” (piriformes) quando são removidos inicialmente, deverão arredondar quando em contacto com a água do mar num período de 20 minutos (Joaquim *et al.*, 2008) (fig. 2.7). Após a selecção dos indivíduos que apresentam um estado de maturação sexual de postura, prosseguiu-se a recolha dos gâmetas, através de contínuas incisões na gónada, para um copo de vidro ou gobelé de 2L, com auxílio de um esguicho, por lavagem com água do mar filtrada e esterilizada por ultra-violeta (U.V.). As incisões foram cuidadosamente efectuadas de maneira a não se estenderem ao hepatopâncreas, a fim de evitar contaminações. Os produtos sexuais obtidos de cada indivíduo foram seguidamente lavados por um crivo de 100µm e no caso dos

gâmetas femininos estes foram retidos por um crivo de 20 μ m, de forma a remover restos de tecido, ovócitos imaturos, fezes, pedaços de concha, etc., resultantes do processo de escarificação. Assim, obteve-se dois copos de 2L com uma suspensão de ovócitos de várias fêmeas e uma suspensão de esperma de vários machos adultos, em água do mar filtrada e esterilizada.

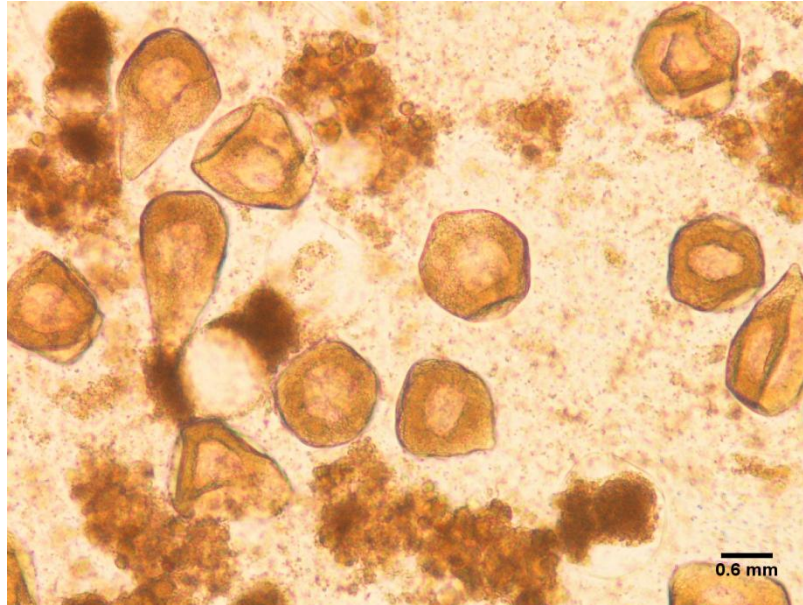


Figura 2.7 Esfregaço de ovócitos de *Crassostrea gigas*, alguns ainda em forma de pêra.

A suspensão de ovócitos foi, então, coberta com folha de alumínio e colocada num local seco durante 2h para promover a maturação dos ovócitos, *i.e.* arredondem em contacto com a água do mar.



Figura 2.8 Espermatozóides de *Crassostrea gigas* à volta do ovócito (56 μ m=0,56mm).

Durante estas duas horas, a suspensão foi homogeneizada (ligeira agitação) ocasionalmente evitando-se assim condições de anóxia. Simultaneamente, a suspensão de esperma foi colocada num local refrigerado (4°C) para evitar a degradação da suspensão e conservar a mobilidade dos

espermatozoides. No fim deste período, observou-se microscopicamente a mobilidade do esperma e a maturação dos ovócitos e após confirmação deu-se início à fecundação *in vitro*. Este passo consistiu sobretudo na adição de cerca de 1 a 2 ml da solução de esperma obtida anteriormente por cada litro de suspensão de ovócitos. Este volume é suficiente para que sejam encontrados, no mínimo, cerca de 10 espermatozoides por ovócito, num campo visível do microscópio (Joaquim *et al.*, 2008) (fig. 2.8). Esta cultura foi mantida num volume de 4L, coberta com folha de alumínio e conservada num local seco e à temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$. Também esta suspensão foi homogeneizada ocasionalmente a fim de se evitar condições de anóxia. A fecundação é detectada inicialmente pelo aparecimento de corpo polar seguida de divisões sucessivas (Joaquim *et al.*, 2008). Uma hora após a adição da solução de esperma, verificou-se a existência de alguns ovócitos já fecundados (fig. 2.9). No entanto, para garantir o máximo de ovócitos fecundados esta cultura permaneceu mais uma hora em repouso, com ocasional homogeneização. Mais do que duas horas, poderia correr-se o risco de haver degradação da cultura.

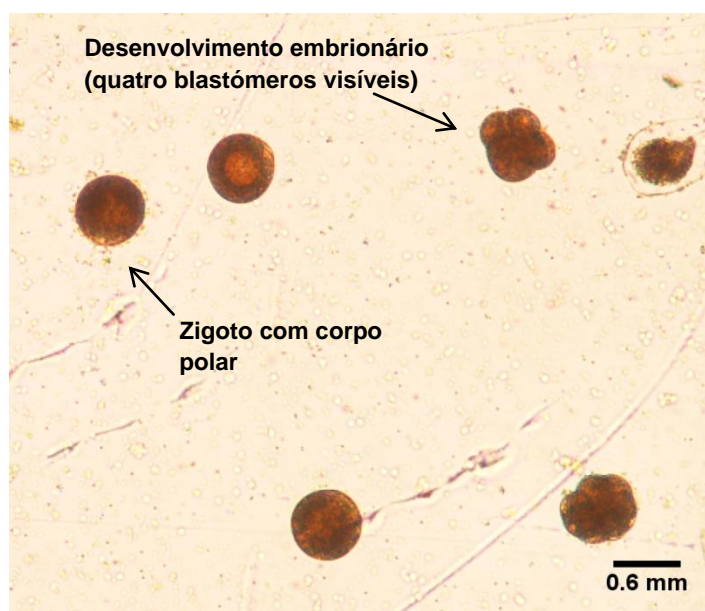


Figura 2.9 Aparecimento das primeiras divisões de *Crassostrea gigas*, três horas após fecundação.

Duas horas após a junção dos gametas, verificou-se a fecundação da maior parte dos ovócitos. A cultura foi lavada e crivada, antes de passar para os tanques de incubação, para retirar o esperma excedente, de forma a evitar a deterioração da cultura (Joaquim *et al.*, 2008). Após a lavagem foi avaliada a taxa de fecundação através da contagem de ovos fecundados e não-fecundados ao microscópio óptico. Numa câmara de contagem reticulada colocaram-se três amostras de 0,1ml da cultura, separadamente, e contabilizou-se a taxa de fecundação de 33,7%. Em média, o número total de ovos fecundados foi na ordem dos 7 890 000 num total de 23 590 000 ovócitos. Após a avaliação do número de ovos fecundados calculou-se o volume da suspensão que foi necessário adicionar em cada tanque de cultura larvar (20L) de forma a ter cerca de 40 ovos/ml.

$$\frac{\text{Volume da suspensão} \times \text{Número de ovos fecundados necessários por tanque}}{\text{Número de ovos fecundados contados na suspensão}} =$$

$$= \frac{4000 \text{ ml} \times (20000 \text{ ml} \times 40 \text{ larvas/tanque})}{7590000} = 402 \text{ ml}$$

O volume distribuído em cada um dos 9 tanques de cultivo larvar (triplicado por cada tratamento) foi de 402 ml (fig. 2.10). O desenvolvimento embrionário até larva “D” (incubação) decorreu durante 36 horas nos tanques de cultivo larvar, sem adição de alimento, uma vez que durante esse período estes são lecitóforos (desenvolvem-se à custa de reservas vitelinas).

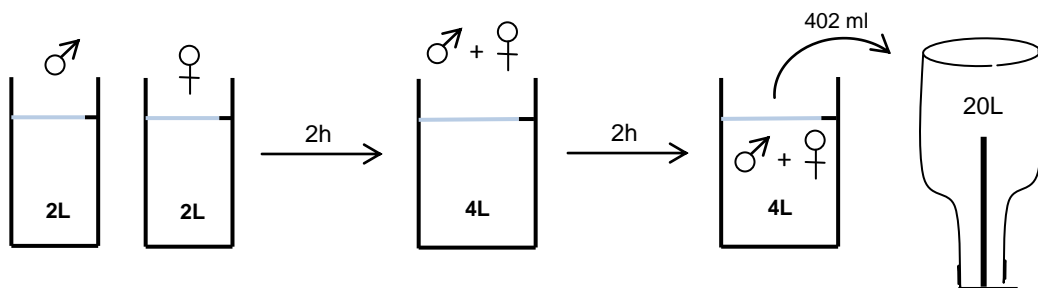


Figura 2.10 Esquema do processo de manipulação dos gametas de *Crassostrea gigas*, fecundação e distribuição nos tanques de cultivo larvar a análise do efeito sobre o desenvolvimento larvar.

Após 36 horas de repouso reexaminou-se a cultura ao microscópio e verificou-se a presença de larvas trocóforas e larvas velíferas “D”. A partir deste ponto iniciou-se o processo de amostragem para a avaliação do efeito de um meio acidificado no desenvolvimento das larvas de ostra, que teve a duração de 11 dias. Ao 11º dia verificou-se uma baixa concentração de larvas sobreviventes tornando-se assim inviável manter o ensaio experimental. Durante esse período foram feitas 5 amostragens, com intervalos de 48 horas cujo objectivo se encontra descrito na tabela 3.1.

Tabela 2.2 Cronologia da amostragem dos parâmetros avaliados na análise do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar

Amostragem (Data)	Horas após fecundação	Descrição dos parâmetros e variáveis a avaliar em cada pH
T1 (25 de Março)	36	Contagem do número de indivíduos em desenvolvimento embrionário parado, larvas normais e anormais e trocóforas; cálculo da taxa de eclosão larvar (larvas velígeras), taxa de larvas velígeras “D” anormais; taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e altura média dorso-ventral.
T2 (28 de Março)	84	Contagem do número de larvas velígeras “D” normais e anormais; cálculo da taxa de velígeras “D” anormais, taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e altura média dorso-ventral.
T3 (30 de Março)	132	Contagem do número de larvas velígeras “D” normais e anormais; cálculo da taxa de velígeras “D” anormais, taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e altura média dorso-ventral.
T4 (01 de Abril)	180	Contagem do número de larvas velígeras “D” normais e anormais; cálculo da taxa de velígeras “D” anormais, taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e altura média dorso-ventral.
T5 (04 de Abril)	252	Contagem do número de larvas velígeras “D” normais e anormais; cálculo da taxa de velígeras “D” anormais, taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e altura média dorso-ventral.

O critério usado na diferenciação entre larvas normais e anormais foi a alteração dos contornos da concha da larva e a presença de protuberâncias do manto.

Todas as amostragens foram realizadas de forma idêntica. O primeiro passo consistiu na concentração das larvas dos tanques de cultura larvar em crivos. Para tal, vazou-se toda a água do tanque, fazendo passar a água por um crivo de 20µm. As larvas retidas no crivo foram lavadas com água do mar filtrada e esterilizada com U.V. e colocadas em copos com 500ml de água do mar filtrada e esterilizada.

A cada suspensão de larvas foi efectuada uma amostragem para se avaliar os parâmetros descritos na tabela 3.1. A cada copo com a suspensão de larvas correspondentes a cada cultura

foram retiradas, com uma pipeta, três amostras de 0,1 μ l e colocadas numa câmara de contagem reticulada. Antes e durante a recolha das amostras homogeneizou-se as culturas para evitar a deposição das larvas no fundo dos copos. Às amostras retiradas juntou-se uma gota de formol tamponizado a 4% para fixar e matar as larvas. Ao microscópio óptico, com a objectiva de 10x, contabilizou-se o número de larvas conforme os parâmetros em estudo. Fez-se a média das contagens e extrapolou-se para o volume total da cultura. Foi ainda determinado o desvio-padrão e erro-padrão. A taxa de mortalidade foi determinada pela diferença entre o número total de larvas contadas e o número total de larvas contadas na amostragem anterior. Simultaneamente, foi retirado um pequeno volume e colocado num frasco devidamente identificado e adicionou-se uma gota de formol para posterior avaliação do crescimento em comprimento (antero-posterior) e altura (dorso-ventral) (fig. 2.11). Na avaliação deste parâmetro colocou-se a amostra na câmara reticulada e ao microscópio foram tiradas fotomicrografias de 30 indivíduos por replicado, num total de 90 indivíduos por tratamento. Neste ensaio, as excepções ocorrerem num replicado do controlo às 36 horas, com a medição de 11 indivíduos apenas, num replicado do controlo às 252 horas, com a medição de 9 indivíduos e um replicado no tratamento pH 7,7 com a medição de 11 indivíduos. Com o auxílio de um programa de processamento e análise de imagem, ImageJ, foi medido o comprimento antero-posterior e altura dorso-ventral das larvas ao longo das várias amostragens (fig. 2.11). Novamente, obteve-se a média do comprimento e altura larvar para cada tratamento, ao longo do tempo de ensaio, e com recurso a uma regressão linear simples obteve-se a taxa de crescimento ($\mu\text{m d}^{-1}$), apenas para as três primeiras amostragens para que se possa comparar a velocidade de crescimento entre os ensaios. O tipo de amostragem adoptada foi uma amostragem aleatória simples.

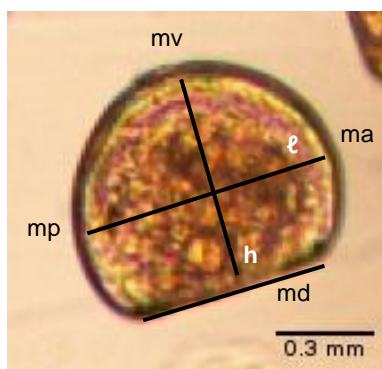


Figura 2.11 Larva velígera “D” de *Crassostrea gigas* em pormenor. md – margem dorsal, ma – margem anterior, mp – margem posterior, mv – margem ventral, l – comprimento antero-posterior e h – altura dorso-ventral.

Após a avaliação das culturas larvares, estas foram colocadas de novo nos respectivos tanques, entretanto cheios com água do mar.

2.3.1 Efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar de *C. gigas*

A 8 de Abril de 2011 deu-se início ao segundo ensaio experimental com vista à avaliação do efeito sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar. A recolha de indivíduos adultos e obtenção de

gâmetas através de escarificação foi efectuada de forma idêntica ao ensaio anterior. Neste ensaio obteve-se um volume de 3000 ml de suspensão de ovócitos e 3000 ml de suspensão de espermatozóides. Após ter-se verificado se os ovócitos já se encontravam maduros (passagem da forma de pêra para esféricos) procedeu-se à fecundação *in vitro*. Neste segundo ensaio a fecundação foi efectuada em três copos de 2L, cada um correspondente a um tratamento de pH diferente (controlo, 7,7 e 7,4) (fig. 2.12). Distribuiu-se a suspensão de ovócitos nos três copos com um volume de 1200 ml em cada. Em seguida adicionou-se 200 ml de solução de espermatozóides, perpez-se 1800 ml com água salgada de cada tratamento e deixou-se a cultura num local seco e à temperatura de $21\pm 1^{\circ}\text{C}$. Após duas horas, com homogeneização pontual, fez-se a contagem de ovos fecundados e não fecundados de forma idêntica ao ensaio anterior. Repetiu-se este processo novamente após três e quatro horas. Em cada um dos tempos determinou-se a taxa de fecundação em cada tratamento (tabela 3.2) visando avaliar o efeito do pH na taxa de fecundação e mobilidade dos espermatozóides.

As taxas de fecundação calculadas foram de 91% para o tratamento de pH de controlo, 81% no tratamento de pH 7,7 e 41% para o tratamento de pH 7,4. Em seguida calculou-se o volume da suspensão necessário adicionar em cada tanque de cultivo larvar de forma a obter-se cerca de 60 larvas/ml.

$$\frac{\text{Volume da suspensão} \times \text{Número de ovos fecundados necessários por tanque}}{\text{Número de ovos fecundados contados na suspensão, ao fim de 4h}}$$

$$\text{Para o tratamento com pH controlo: } \frac{1800 \text{ ml} \times (20000 \text{ ml} \times 60 \text{ larvas/tanque})}{1090 \times 10^3} = 198 \text{ ml}$$

$$\text{Para o tratamento com pH 7,7: } \frac{1800 \text{ ml} \times (20000 \text{ ml} \times 60 \text{ larvas/tanque})}{902 \times 10^3} \approx 240 \text{ ml}$$

$$\text{Para o tratamento com pH 7,4: } \frac{1800 \text{ ml} \times (20000 \text{ ml} \times 60 \text{ larvas/tanque})}{482 \times 10^3} \approx 448 \text{ ml}$$

Assim o volume distribuído nos três replicados do tratamento de pH controlo foi de 198ml, para o tratamento de pH 7,7 foi de aproximadamente 240 ml e para o tratamento de pH 7,4 foi aproximadamente 448 ml. A incubação dos ovos decorreu durante 48 horas.

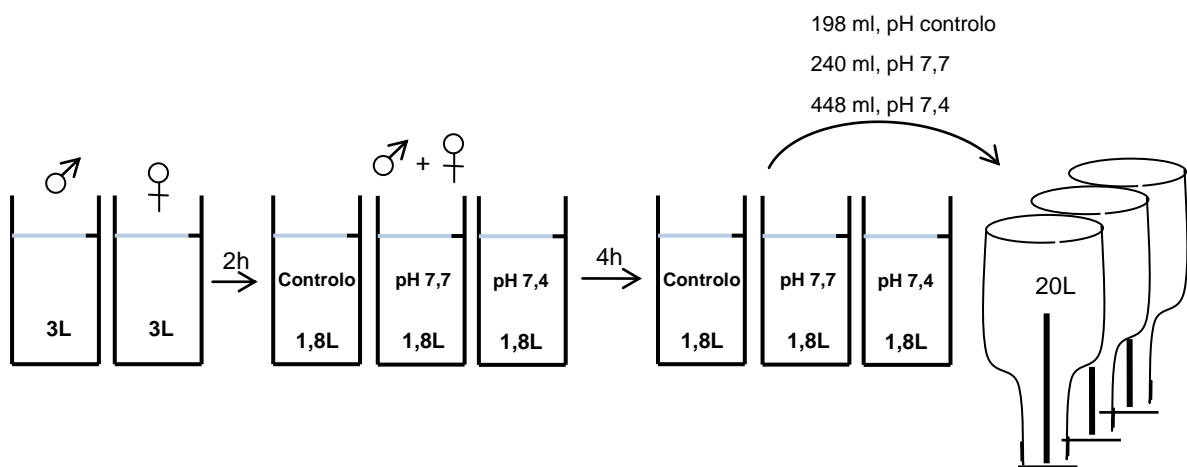


Figura 2.12 Esquema do processo de manipulação dos gametas de *C. gigas*, fecundação e distribuição nos tanques de cultivo larvar, para a análise do efeito sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Após a incubação reexaminou-se a cultura ao microscópio e verificou-se a presença de larvas trocóforas e larvas velígeras “D”. Este ensaio teve a duração de apenas 5 dias (tabela 3.3). A avaliação dos parâmetros descritos na tabela 3.3 da cultura larvar foi efectuada de forma idêntica ao ensaio experimental anterior.

Tabela 2.3 Cronologia da amostragem dos parâmetros avaliados na análise do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Amostragem (Data)	Horas após fecundação	Descrição dos parâmetros e variáveis a avaliar em cada pH
T1 (10 de Abril)	48	Contagem do número de indivíduos em desenvolvimentos embrionários parados, larvas normais, anormais e trocóforas; cálculo da taxa de eclosão larvar, taxa de larvas velígeras “D” anormais; taxa de trocóforas; taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e da altura média dorso-ventral.
T2 (12 de Abril)	96	Contagem do número de larvas velígeras “D” normais e anormais; cálculo da taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e da altura média dorso-ventral.
T3 (14 de Abril)	144	Contagem do número de larvas velígeras “D” normais e anormais; cálculo da taxa de mortalidade; avaliação do crescimento sobre o comprimento médio antero-posterior e da altura média dorso-ventral.

O critério de diferenciação de larvas normais e anormais foi idêntico ao efetuado no ensaio anterior.

Também neste ensaio, se calculou a média das contagens e extrapolou-se para o volume total da cultura. Foi ainda determinado o desvio-padrão e erro-padrão. Novamente, foi retirado um pequeno volume e colocado num frasco devidamente identificado e adicionou-se uma gota de formol para posterior avaliação do crescimento em comprimento (antero-posterior) e altura (dorso-ventral) (fig. 2.11). Tal como no ensaio anterior, a avaliação deste parâmetro colocou-se a amostra na câmara reticulada e ao microscópio foram tiradas fotomicrografias de 30 indivíduos por replicado, num total de 90 indivíduos por tratamento. Neste ensaio, as exceções ocorrerem num replicado do controlo às 144 horas, com a medição de apenas 15 indivíduos. Com o mesmo programa de processamento e análise de imagem, ImageJ, foi medido o comprimento antero-posterior e altura dorso-ventral das larvas ao longo das várias amostragens. Novamente, obteve-se a média do comprimento e altura larvar para cada tratamento, ao longo do tempo de ensaio, e com recurso a uma regressão linear simples obteve-se a taxa de crescimento (μmd^{-1}). O tipo de amostragem adoptada foi uma amostragem aleatória simples.

No final de cada amostragem as culturas larvares foram colocadas novamente nos respectivos tanques.

2.4 Alimentação

Após as primeiras 36 horas do primeiro ensaio e as 48 horas do segundo ensaio (incubação) a alimentação das larvas foi feita pela adição da microalga marinha unicelular, *Isochrysis aff. galbana* (T-ISO), a única fonte de alimento. O alimento foi ministrado diariamente através de uma bomba peristáltica multicanais, para manter uma concentração celular no tanque de cultura de 50 a 100 cel/ μl .

Esta microalga marinha é cultivada na EEMT, juntamente com outras microalgas marinhas, como suporte alimentar para larvas, juvenis e bivalves adultos.

2.5 Tratamento estatístico

O tratamento estatístico foi feito com o programa SigmaStat[®] (versão 3.5) aplicando o modelo de análise de variância a dois-factores (ANOVA II), estabelecendo como variáveis independentes o tipo de tratamento (controlo, pH 7,7 e pH 7,4), o tempo de ensaio (36h, 84h, 132h, 180h e 252h para a análise do efeito sobre o desenvolvimento larvar e 48h, 96h e 144h para a análise do efeito sobre a fecundação e desenvolvimento larvar). Os dados em percentagem sofreram a transformação de raiz quadrada do Arcseno, anteriormente à análise estatística. Os testes de normalidade e de homogeneidade de variâncias foram aplicados pelo programa SigmaStat[®]. Para a análise que não passou no teste de homogeneidade de variâncias usou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W.) e a análise de variância a um-factor (ANOVA). Na sequência da confirmação de diferenças significativas entre as médias, efectuou-se testes *post-hoc* (Teste de

Tukey, Método de Duncan e Método de Dunn) de acordo com a indicação do programa usado, com um grau de confiança de 95% ($\alpha=0,05$).

3. RESULTADOS

Neste capítulo apresentam-se os resultados obtidos de acordo com a metodologia descrita no capítulo anterior, sobre o efeito da acidificação dos oceanos na fecundação e desenvolvimento larvar da ostra japonesa, *C. gigas*.

3.1 Efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar de *C. gigas*

A taxa de eclosão larvar média (%), que corresponde à percentagem de ovos eclodidos em cada tratamento, calculada 36 horas após fecundação, foi de 67% para o controlo, 79% para o tratamento pH 7,7 e 82% para o tratamento pH 7,4 (fig. 3.1).

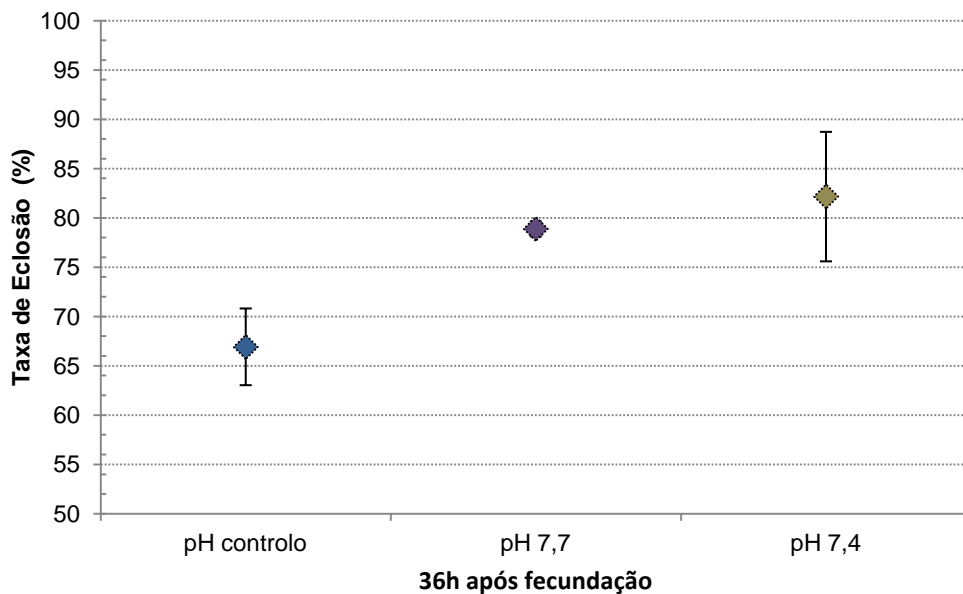


Figura 3.1 Taxa de eclosão larvar média (%) de *Crassostrea gigas*, 36h após fecundação, nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP, n=3).

A evolução da taxa de mortalidade ao longo do período experimental encontra-se representada na figura 3.2. De um modo geral, a taxa de mortalidade no final do período experimental foi sempre crescente em todos os tratamentos aproximando-se de 100% ao fim das 252 horas, após fecundação. A taxa de mortalidade apresentou valores muito baixos às 36 horas após fecundação, na ordem dos 8-10%. Entre as 36 e 84 horas após fecundação, verificou-se um acréscimo acentuado da mortalidade larvar no tratamento pH 7,4 de 65%. O controlo e o tratamento pH 7,7 acompanharam este aumento mas de forma mais ligeira (41,4% e 27%, respectivamente). Este aumento foi contínuo até ao final do ensaio. Às 84 horas, entre o pH 7,4 e o pH 7,7 a diferença é claramente significativa (ANOVA, $F=19,136$, $df=2$, $P<0,001$, Método de Duncan - $P<0,05$) e o pH 7,4 e o tratamento controlo (ANOVA, $F=19,136$, $df=2$, $P\leq 0,001$, Método de Duncan - $P<0,05$). Após as 84 horas, a mortalidade é demasiado elevada em todos os tratamentos.

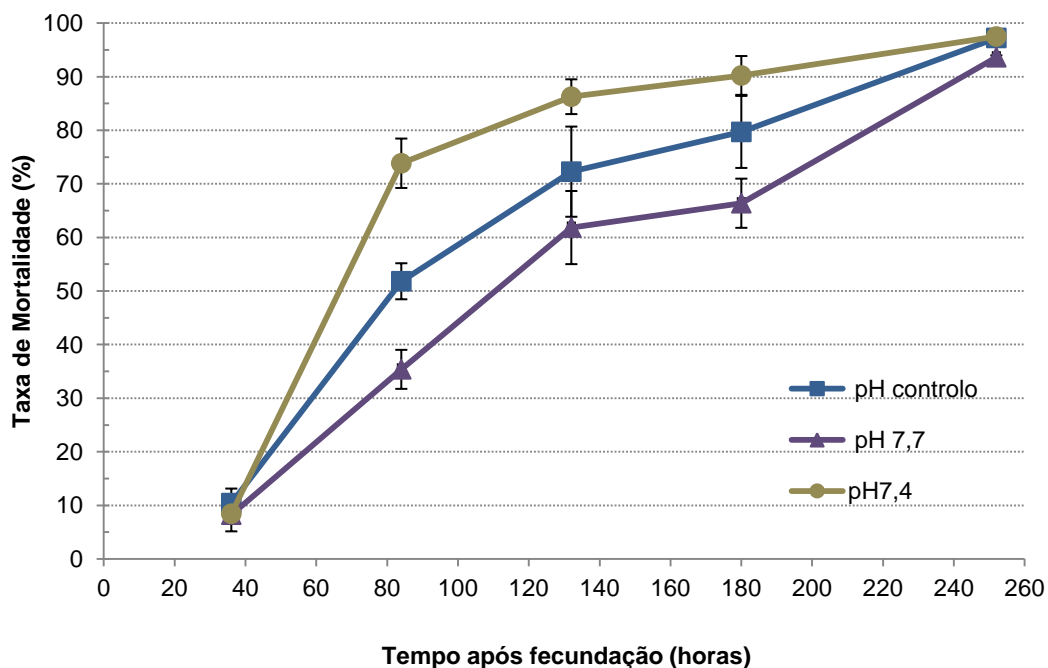


Figura 3.2 Taxa de mortalidade média larvar (%) de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3)

A taxa de velígeras anormais é a percentagem de larvas vivas anormais (*i.e.* com deformações na forma da concha), numa média de três replicados por cada tratamento (fig.3.3).

Tabela 3.4 Exemplos da variação na morfologia da larva velígera “D” de *Crassostrea gigas*, nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar

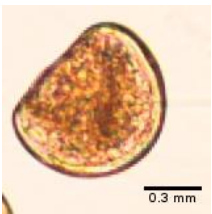

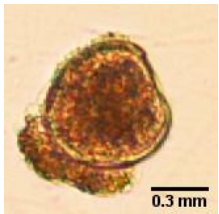
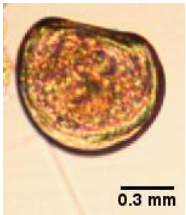
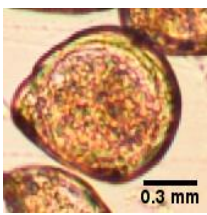
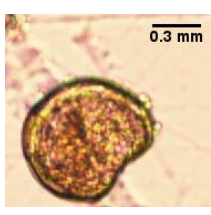

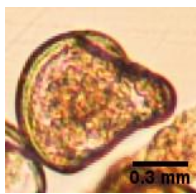




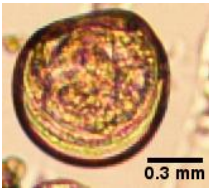
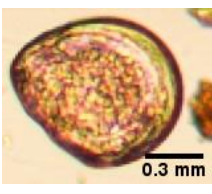

Horas após fecundação	Controlo	pH 7,7	pH 7,4
36			
84			

Tabela 3.4 (cont.) Exemplos da variação na morfologia da larva velígera “D” de *Crassostrea gigas*, nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar

Horas após fecundação	Controlo	pH 7,7	pH 7,4
132			
180			
252			

Pelo gráfico na figura 3.3 verificou-se que os tratamentos com pH 7,7 e 7,4 apresentam 20-30% mais larvas velígeras “D” anormais do que o tratamento controlo. Estatisticamente, existem diferenças significativas na taxa de velígeras anormais para os tratamentos em estudo (ANOVA II, $F=27,934$, $df=2$, $P<0,001$, Teste de Tukey $P<0,05$). No entanto, também o tempo influi significativamente sobre esta variável (ANOVA II, $F=50,448$, $df=4$, $P<0,001$), uma vez que se verifica um padrão de decréscimo para todos os tratamentos, ao longo do ensaio, consistente com a degradação e desaparecimento das larvas anormais. Os baixos valores de velígeras anormais medidos às 36 horas após fecundação deve-se a um erro de amostragem associado à identificação da passagem da larva trócofora para velígera “D”, criando a ilusão de haver um pico irregular de velígeras anormais às 84 horas.

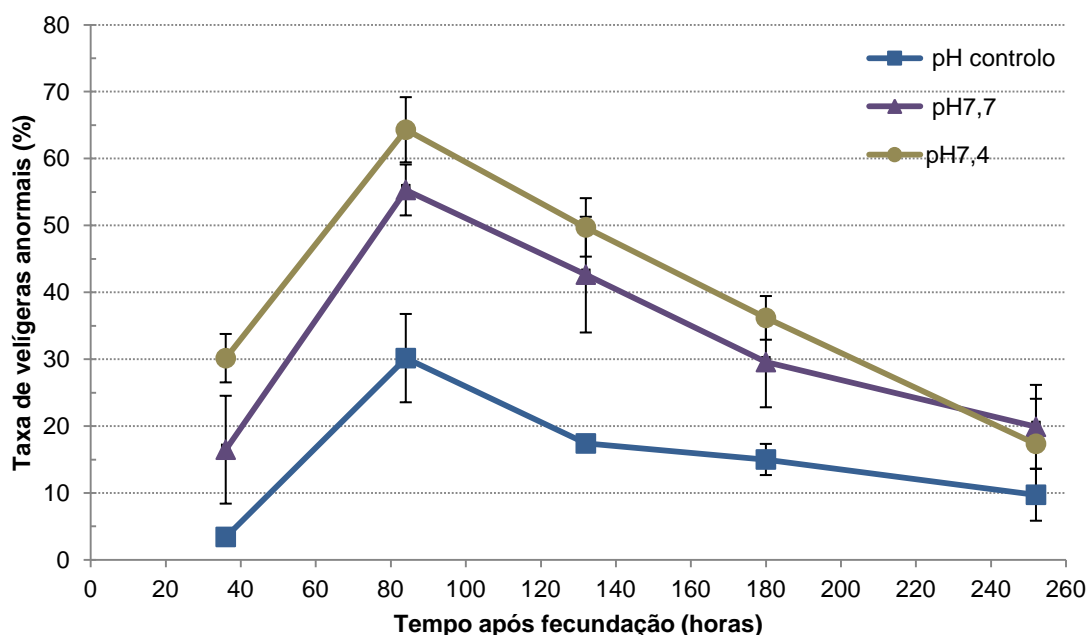


Figura 3.3 Taxa média de velígeras anormais (%) de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3).

A tabela 4.2 resume as diferenças entre a taxa de velígeras normais e anormais (%) para cada tratamento, ao longo deste ensaio.

Tabela 3.5 Comparação da taxa de velígeras “D” normais e anormais (%) de *Crassostrea gigas*, durante o efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média±EP;n=3).

Horas após fecundação	Taxa de velígeras normais (%)			Taxa de velígeras anormais (%)		
	Controlo	pH 7,7	pH 7,4	Controlo	pH 7,7	pH 7,4
36	96,6±1,2	83,5±8,1	69,9±3,6	3,4±1,2	16,5±8,1	30,2±3,6
84	69,85±6,6	44,7±3,8	35,7±4,9	30,2±6,6	55,3±3,8	64,3±4,9
132	82,6±0,8	57,4±8,7	50,3±4,4	17,4±0,8	42,6±8,7	49,7±4,4
180	85±2,3	70,4±6,8	63,8±3,3	15±2,3	29,6±6,8	36,2±3,3
252	90,1±3,9	80,1±6,3	82,7±6,7	9,7±3,9	19,9±6,3	17,4±6,7

A variação do comprimento médio larvar antero-posterior (μm) encontra-se representada na figura 3.4. Esta variável apresenta diferenças significativas entre o tratamento controlo e o pH 7,4 (K-W., $H=257,909$, $df=2$, $P<0,001$, Método de Dunn e Teste de Tukey – $P<0,05$), com uma diferença inicial de comprimento larvar de 10 μm . De um modo geral verificou-se um aumento do crescimento em comprimento médio larvar antero-posterior até às 180 horas após fecundação,

estabilizando entre 180 e 252 horas (típico do início da metamorfose). Apesar da taxa de crescimento larvar para o tratamento pH 7,4 ser de $2,56 \mu\text{md}^{-1}$ ($R^2 = 0,94$) e para o controlo ser de $1,66 \mu\text{md}^{-1}$ ($R^2 = 0,93$), entre as 84 e 132 horas, verificou-se que as larvas velígeras “D” no início do ensaio já são maiores no controlo (82,6 μm) do que no tratamento pH 7,4 (73,2 μm). Para o tratamento pH 7,7, a curva do comprimento médio larvar está muito próxima da curva do controlo, não se verificando diferenças significativas no comprimento médio entre as 84 e 252 horas após fecundação (K-W., $H=257,909$, $df=2$, $P<0,001$, Método de Dunn e Teste de Tukey – $P>0,05$). A taxa de crescimento larvar para o tratamento pH 7,7 foi também de $1,66 \mu\text{md}^{-1}$ ($R^2 = 0,71$).

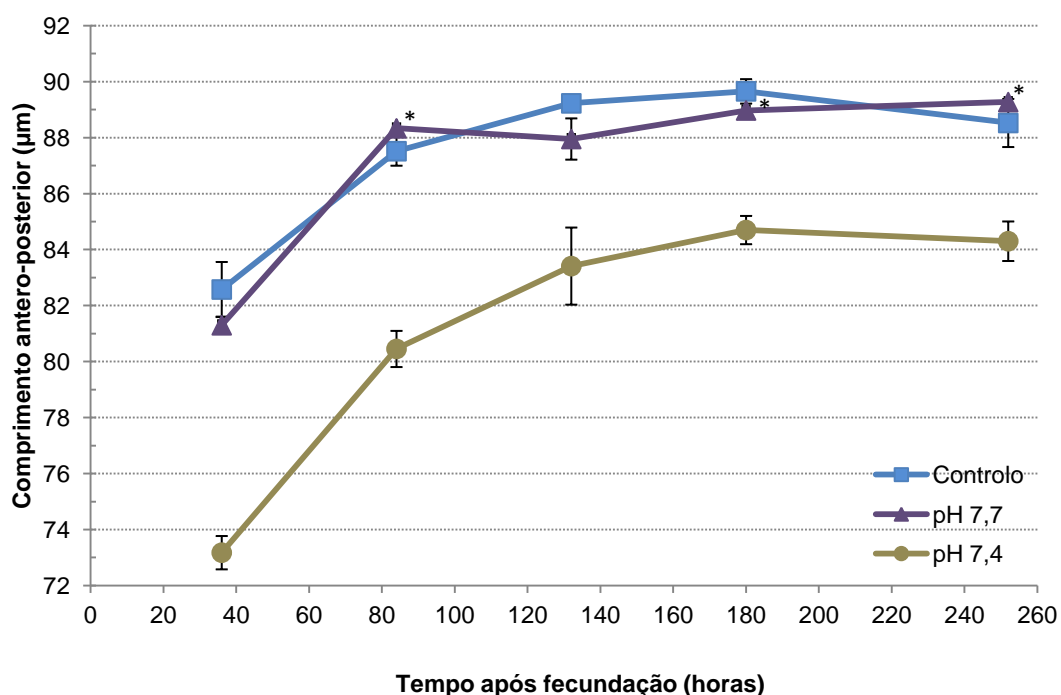


Figura 3.4 Variação do comprimento antero-posterior médio larvar (μm) de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média \pm EP; $n=3$ e $n^*=2$).

A variação da altura média larvar dorso-ventral (μm) encontra-se representada na figura 3.5. Neste parâmetro, os resultados obtidos são muito semelhantes aos observados para o comprimento médio larvar antero-posterior, tal como esperado. Existiu uma clara diferença entre os tratamentos controlo e pH-0,7 (K-W., $H=191,992$, $df=2$, $P<0,001$, Método de Dunn – $P<0,05$), onde apesar das taxas de crescimento em altura serem semelhantes ($1,96 \mu\text{md}^{-1}$, com $R^2=0,90$ e de $2,26 \mu\text{md}^{-1}$, com $R^2=0,89$, respectivamente) entre as 36 e 132 horas, a altura média das larvas velígeras “D” no controlo apresentou valores superiores às 36 horas (68,6 μm) do que as larvas velígeras “D” em pH 7,4 (62,4 μm). Os valores da altura dorso-ventral medidos para o tratamento pH 7,7 são muito próximos dos valores medidos para o tratamento controlo, havendo diferenças significativas entre eles apenas às 180 horas (K-W., $H=257,909$, $df=2$, $P<0,001$, Método de Dunn – $P<0,05$). A taxa

de crescimento larvar em altura para o tratamento pH 7,7 foi no entanto mais baixa do que os restantes tratamentos ($1,57 \mu\text{md}^{-1}$).

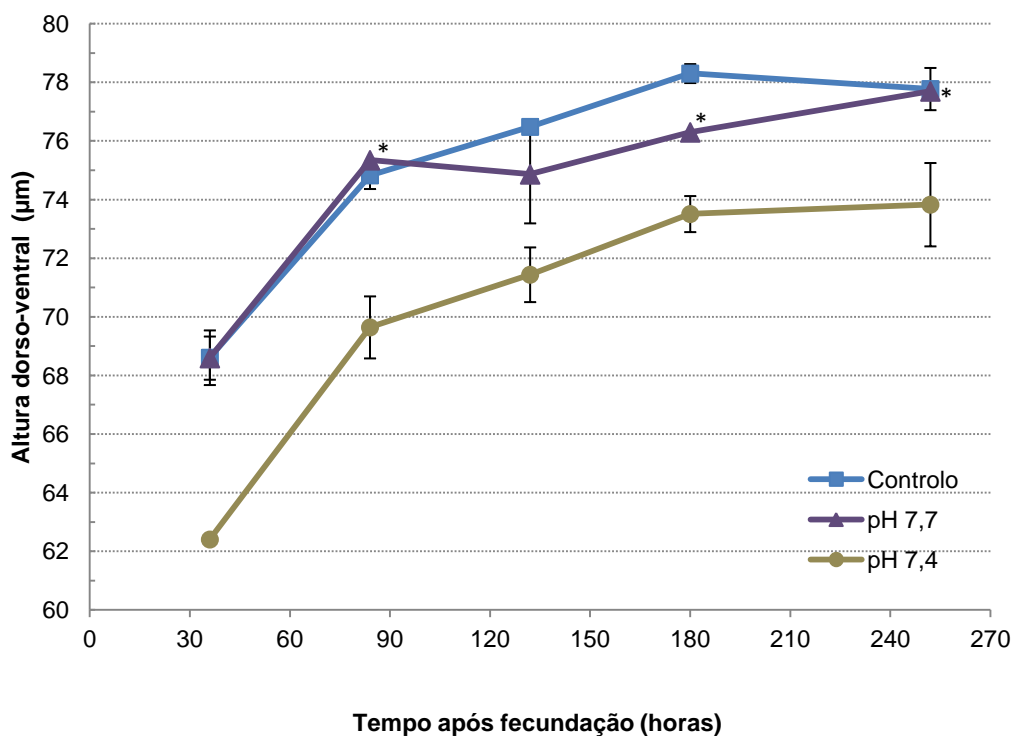


Figura 3.5 Variação da altura dorso-ventral média larvar (μm) de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar (média \pm EP; n=3 e n*=2).

Em relação à morfologia da larva velígera “D”, ao longo do tempo de ensaio, observaram-se diferenças nos três tratamentos, sobretudo ao nível da prodissoconcha I (tabela 4.1). Ao longo do tempo do ensaio, as larvas “D” que cresceram no tratamento controlo mantêm a sua forma original em “D” até às 180 horas e às 252 horas verificou-se o desenvolvimento da larva velígera para larva umbolada. No tratamento pH 7,7 as deformações na concha são bastante visíveis logo a partir das 36 horas até às 252 horas após fecundação. Também no tratamento pH 7,4 observou-se alterações ao nível da concha. Para além disso, as larvas velígeras “D” neste tratamento foram visivelmente mais pequenas (ver fig. 3.4 e 3.5) e arredondadas. No que se refere ao manto das larvas, nota-se uma maior uniformidade e consistência na massa interior das larvas velígeras do controlo, em oposição a um agrupamento desigual dos órgãos. Às 36 horas, para o tratamento pH 7,4, verificou-se um largo número de larvas velígeras com protuberância no manto. Esta irregularidade atenuou ao longo do ensaio, possivelmente pelo desaparecimento destas larvas em prol das larvas mais resistentes. Estas imagens foram recolhidas com base no aparecimento desde tipo de deformações ao longo das várias observações ao microscópio.

3.2 Efeito da acidificação sobre a fecundação e desenvolvimento larvar de *C. gigas*

A taxa de fecundação foi mais elevada no tratamento controlo do que nos restantes tratamentos. Ao fim de duas horas, o número total de ovos fecundados no tratamento pH 7,7 foi inferior ao número de ovos contabilizados no controlo em cerca de 24%, em relação ao tratamento pH 7,4 e o controlo a diferença foi mais acentuada, com um decréscimo de 79% de ovos fecundados (tabela 4.3). Ao fim de três e quatro horas, esta diferença diminui mas continua a ser superior a 50%. A contagem feita ao fim de quatro horas para o tratamento pH 7,7 apresenta um número inferior de ovos em relação à hora anterior, atribuindo-se esta irregularidade a um erro de amostragem associado à metodologia de recolha das amostras. Simultaneamente à avaliação da taxa de fecundação, observou-se também o efeito do decréscimo de pH na mobilidade dos espermatozóides que vai de encontro aos resultados obtidos na taxa de fecundação. Pôde-se observar que a mobilidade do esperma diminuía com o aumento da acidez do meio.

Tabela 3.6 Contagem de ovos fecundados e não fecundados de *Crassostrea gigas* ao fim de 2h, 3h e 4h após a fecundação *in vitro*, nos três tratamentos em estudo nos três tratamentos do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Horas, após junção dos gâmetas	Ovos fecundados ($\times 10^3$)			Ovos não fecundados ($\times 10^3$)		
	Controlo	pH 7,7	pH 7,4	Controlo	pH 7,7	pH 7,4
Ao fim de 2 horas:	952	731	205	234	416	979
Ao fim de 3 horas:	976	1125	437	158	266	796
Ao fim de 4 horas:	1090	902	482	106	212	686

Para a análise do efeito de pH sobre a fecundação e desenvolvimento larvar, começou-se por contabilizar a taxa de fecundação em cada tratamento e de acordo com a figura 3.6 verificou-se que a taxa de fecundação mais elevada corresponde ao tratamento de controlo, com 91% de ovos fecundados num volume de 1800ml. Segue-se o tratamento de pH 7,7 com 81% de ovos fecundados e por último o tratamento pH 7,4 com 41% de ovos fecundados, no mesmo volume. Salienta-se que os tratamentos mais ácidos geraram taxas de fecundação mais baixas, chegando mesmo a haver uma diferença de 50% entre o tratamento pH 7,4 e o controlo.

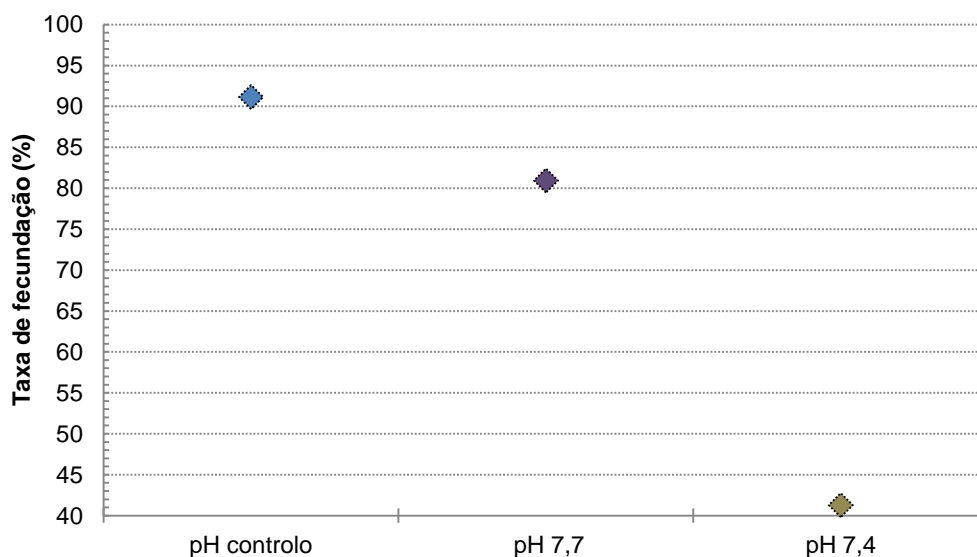


Figura 3.6 Taxa de fecundação (%), de *Crassostrea gigas*, nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

As taxas de eclosão média larvar (%), para cada tratamento, 48 horas após a fecundação encontram-se representadas na figura 3.7. Em análise, verifica-se que a taxa de eclosão é consistente com os resultados obtidos para a taxa de fecundação, havendo uma maior percentagem de larvas velíferas eclodidas no controlo, 93%, em contraste com 87% do tratamento pH 7,7 e 77% do tratamento pH 7,4. O tratamento pH 7,4 apresentou uma taxa de eclosão inequivocamente inferior ao controlo mas, no entanto, apesar do valor médio da taxa de fecundação do tratamento pH 7,7 estar abaixo do controlo, o erro padrão não esclarece a influência deste pH na taxa de eclosão.

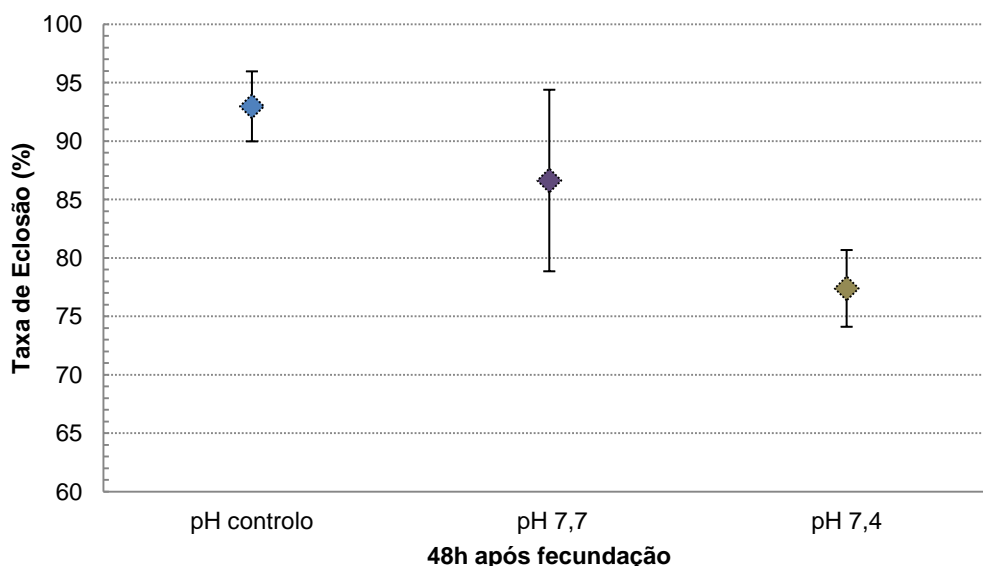


Figura 3.7 Taxa de eclosão média larvar (%), de *Crassostrea gigas*, 48h após fecundação, nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média±EP; n=3).

A evolução da taxa de mortalidade média (%) para cada tratamento deste ensaio apresenta-se na figura 3.8. A sua progressão foi diferente nos três tratamentos, confirmando-se a existência de diferenças significativas entre o tratamento controlo e o tratamento pH 7,7 e 7,4 (K-W., $H=15,701$, $df=2$, $P\leq 0,001$, Teste de Tukey - $P<0,05$). O tratamento controlo apresentou valores baixos de mortalidade média ao longo das 144 horas de ensaio, não indo além dos 34%. O tratamento pH 7,7 apresenta uma taxa de mortalidade média inicial baixa, 12,6%, seguida de um aumento exponencial a partir das 96 horas, aproximando-se dos 83% de larvas velígeras “D” mortas no final do ensaio. O tratamento pH 7,4 distingue-se fortemente do tratamento controlo (K-W., $H=15,701$, $df=2$, $P\leq 0,01$, Teste de Tukey $P<0,05$), partindo de uma taxa de mortalidade inicial de 31%, ultrapassando o dobro deste valor em 48h (84%), chegando a uma taxa de 98% de mortalidade larvar média às 144 horas após fecundação. O tratamento pH 7,7 não apresenta diferenças significativas em relação ao tratamento pH 7,4 (K-W., $H=15,701$, $df=2$, $P\leq 0,01$, Teste de Tukey $P>0,05$).

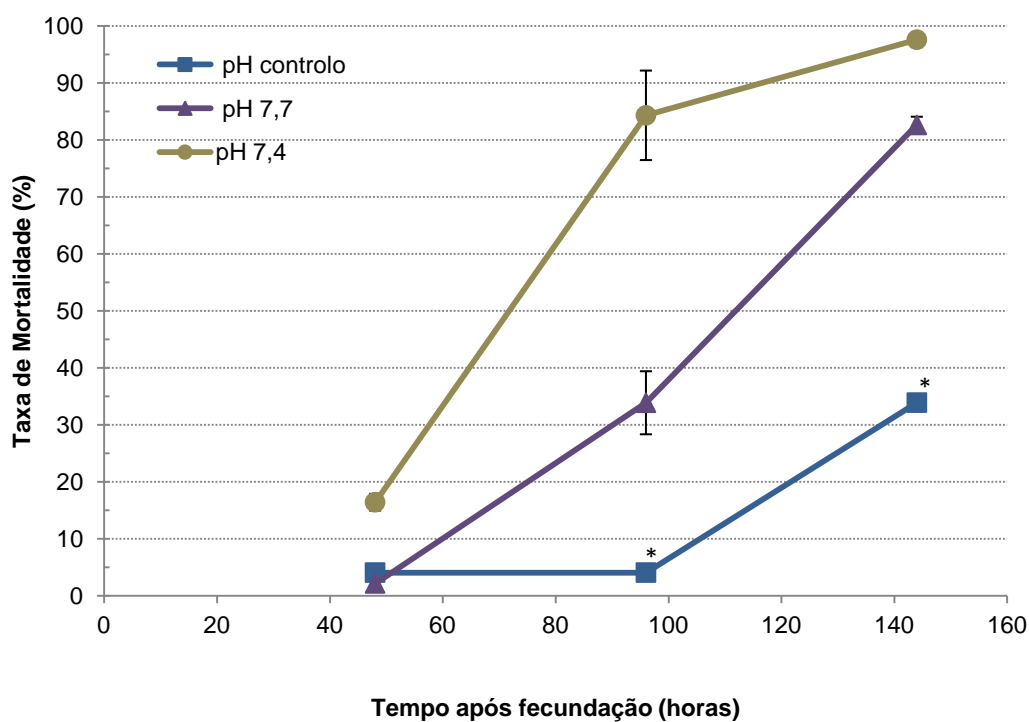


Figura 3.8 Taxa de mortalidade média larvar (%), de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média±EP; $n=3$ e $n^*=2$).

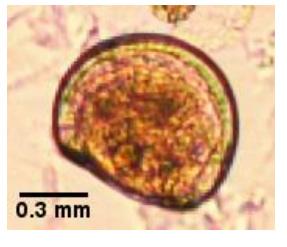



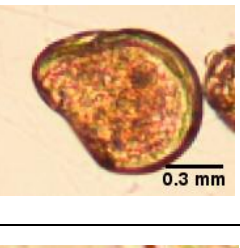
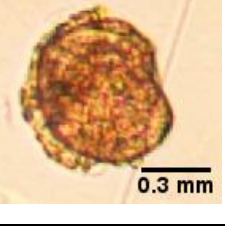
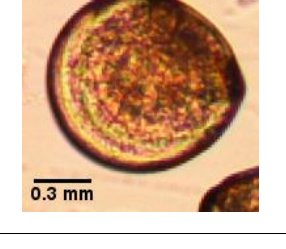

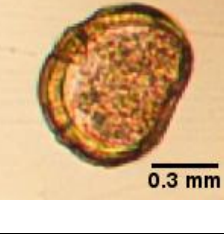
Na tabela 3.3 pode-se comparar a variação entre a taxa de velígeras normais e anormais (%) para cada tratamento, neste ensaio.

Tabela 3.7 Comparação da taxa de velíferas “D” normais e anormais (%) de *Crassostrea gigas*, nos três tratamentos em estudo para ensaio sobre o efeito do pH na taxa de fecundação e desenvolvimento larvar (média±EP;n=3 e n*=2).

Horas após fecundação	Taxa de velíferas normais (%)			Taxa de velíferas anormais (%)		
	Controlo	pH 7,7	pH 7,4	Controlo	pH 7,7	pH 7,4
48	82,8±1,2	42,9±8,1	30,7±3,6	17,2±8,9	53,8±12	69,3±4,2
96	97,73*	57±3,8	29,71*	2,27*	43±8,7	70,3*
144	96,1*	77,9±8,7	96,13*	3,87*	22,1±6,4	51,8*

No que se refere à taxa média de velíferas anormais (%) o gráfico representado na figura 3.9 aparenta uma certa variância entre os três tratamentos em estudo, no entanto, estatisticamente apenas se confirmam diferenças significativas entre os três tratamentos às 96 horas (ANOVA, $F=22,383$, $df=2$, $P\leq 0,001$, Método de Duncan – $P<0,05$). Para as restantes horas verificou-se apenas diferenças significativas entre o controlo e o pH 7,4 (K-W., $H=9,418$, $df=2$, $P=0,009$, Teste de Tukey – $P<0,05$). À semelhança do que ocorreu no ensaio anterior, o critério usado na diferenciação entre larvas normais e anormais foi a alteração da forma da concha e do manto (ver tabela 4.5). O controlo foi o tratamento com a taxa média de velíferas anormais mais baixa, seguido pelo tratamento pH 7,7 e por último o tratamento pH 7,4 variando entre os 50-70%. Verificou-se em todos os tratamentos uma tendência para um decréscimo na taxa de velíferas “D” anormais ao longo do tempo, de acordo com o esperado.

Tabela 3.8 Exemplos da variação na morfologia da larva velígera "D" de *Crassostrea gigas* nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Horas após fecundação	Controlo	pH 7,7	pH 7,4
48			
96			
144			

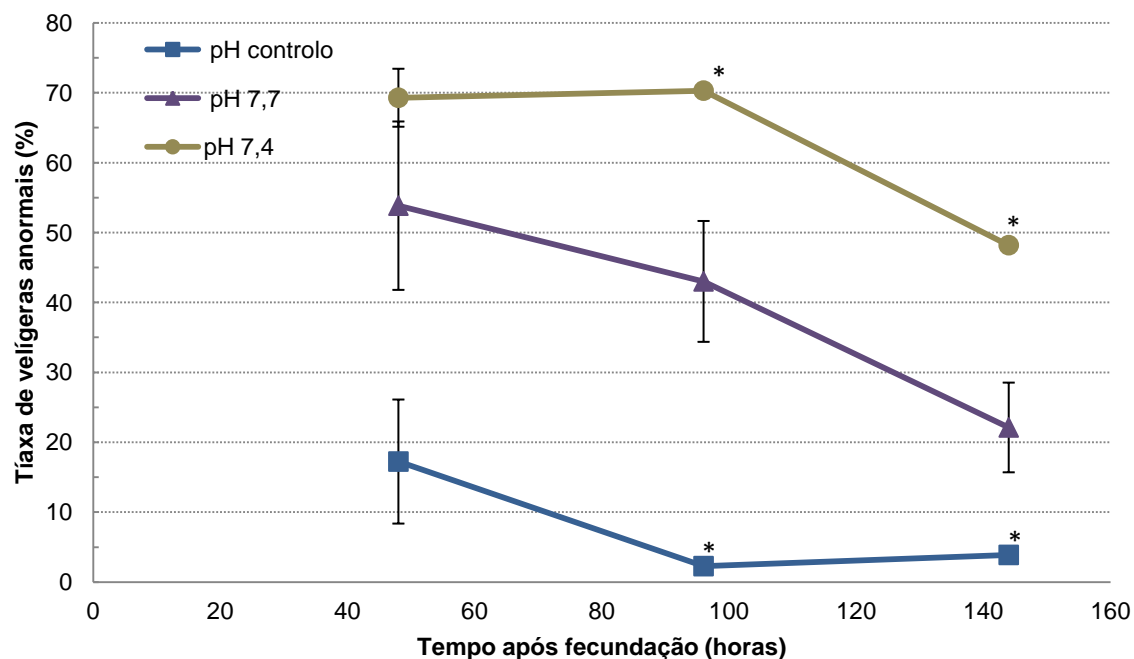


Figura 3.9 Taxa de velígeras anormais (%), de *Crassostrea gigas* ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média \pm EP; n=3 e n*=2).

Na figura 3.10 encontra-se representado a variação do comprimento médio larvar antero-posterior em cada tratamento (μm). A acidez do meio é preponderante sobre esta variável (K-W., $H=267,023$, $df=2$, $P\leq 0,001$). O tratamento controlo apresentou valores de comprimento médio acima dos restantes tratamentos, em todas as amostragens com uma taxa de crescimento de $2,2 \mu\text{m d}^{-1}$, as larvas velígeras apresentaram no final do ensaio um comprimento médio de $94,3 \mu\text{m}$. O tratamento pH7,7 apresentou um comprimento médio inicial inferior ao tratamento controlo e as larvas cresceram a uma velocidade de $1 \mu\text{m d}^{-1}$, ficando muito abaixo do comprimento médio observado no tratamento controlo no fim do ensaio, com $84 \mu\text{m}$. As larvas do tratamento pH7,4 exibem um comprimento médio inicial menor do que os restantes tratamentos mas crescem, no entanto, a uma velocidade de $2,2 \mu\text{m d}^{-1}$ atingindo no final do ensaio experimental um comprimento médio semelhante ao tratamento pH7,7, de $83 \mu\text{m}$. Estatisticamente confirma-se a influência do pH 7,7 e 7,4 no comprimento antero-posterior médio larvar nas larvas velígeras “D” de *C. gigas* (K-W., $H=267,023$, $df=2$, $P\leq 0,001$, Método de Dunn – $P<0,05$).

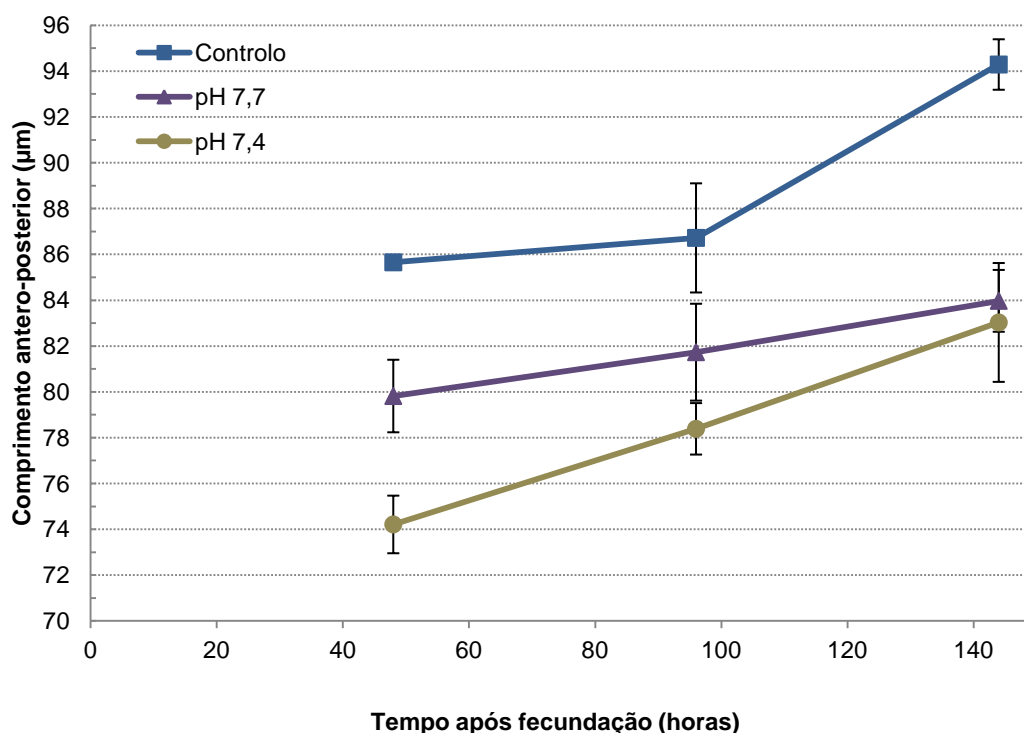


Figura 3.10 Variação do comprimento médio larvar antero-posterior (μm), de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média \pm EP; $n=3$).

A variação da altura média larvar dorso-ventral (μm) apresentada na figura 3.11 evolui de forma análoga ao comprimento médio larvar antero-posterior, como esperado, apresentando também diferenças significativas entre os pH em estudo (K-W., $H=233,199$, $df=2$, $P\leq 0,001$, Método de Dunn – $P<0,05$). A variação do crescimento em altura foi bastante idêntica ao longo do ensaio, variando apenas em termos quantitativos. O crescimento larvar no controlo apresenta uma taxa de

$2,6 \mu\text{md}^{-1}$ ($R^2=0,94$), no tratamento pH 7,7 a taxa de crescimento foi de $1,4 \mu\text{md}^{-1}$ ($R^2=0,99$) e no tratamento pH 7,4 as larvas velígeras cresceram a $2,2 \mu\text{md}^{-1}$ ($R^2=0,93$) mas não chegam a atingir a altura registada no tratamento controlo.

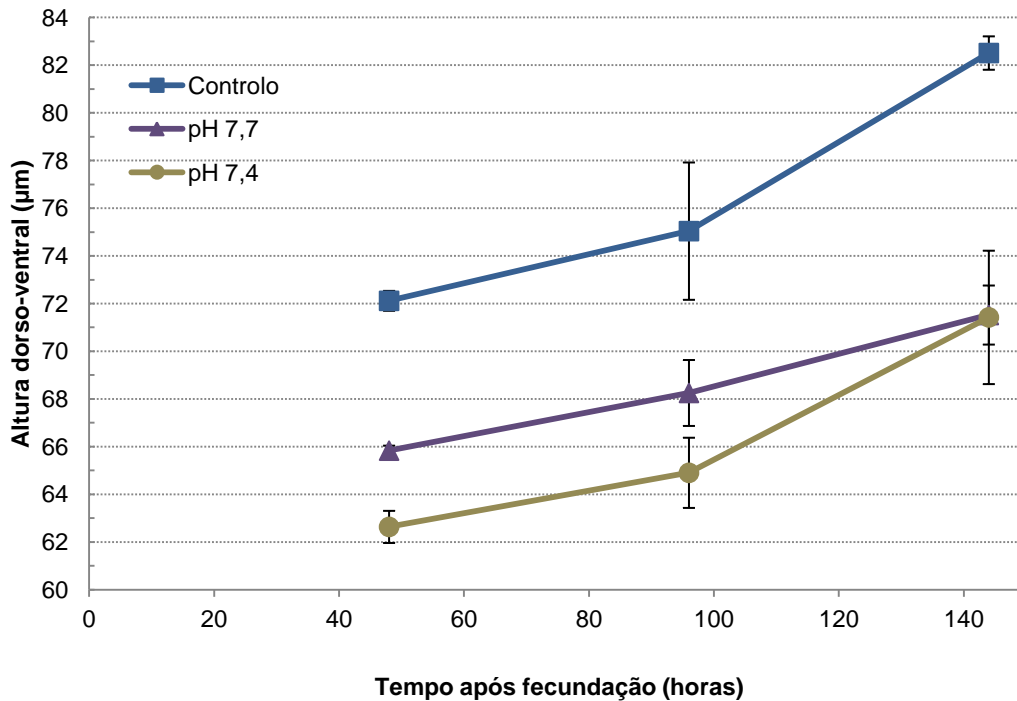


Figura 3.11 Variação da altura média larvar dorso-ventral (μm) de *Crassostrea gigas*, ao longo do tempo (horas) nos três tratamentos em estudo do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar (média \pm EP; n=3).

A morfologia das larvas velígeras “D” durante o ensaio sobre o efeito da acidificação sobre a fecundação e desenvolvimento larvar, está representada na tabela 4.5. Tal como verificado no ensaio anterior, foram visíveis as diferenças no desenvolvimento larvar ocorrido nos três tratamentos. No controlo, as larvas velígeras “D” mantêm a sua forma original durante todo o ensaio, apresentando uma concha cada vez mais definida e consistente ao longo do tempo. Já nos tratamentos pH 7,7 e pH 7,4 as conchas das larvas velígeras mostram-se bastante deformadas. No tratamento pH 7,7 a margem dorsal é afectada, sobretudo nas 96 e 144 horas, e foi visível ao microscópio alguma debilidade da concha. Também no tratamento pH 7,4 distingue-se malformações na margem dorsal da larva e uma concha mais fina às 96 horas. Às 144 horas detectou-se ao microscópio algumas fissuras na concha. Estas imagens foram recolhidas com base no aparecimento desde tipo de deformações ao longo das várias observações ao microscópio.

4. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho, sob ambiente controlado, fornecem evidências da alteração na fecundação e desenvolvimento larvar de *C. gigas* quando exposta, a curto-prazo, a um decréscimo de pH proporcionado pelo aumento de CO₂ no meio com uma temperatura média diária de 21±1°C.

4.1 Mobilidade do esperma e Taxa de fecundação

Apesar de não ter sido quantificada a actividade do esperma, visualmente detectou-se ao microscópio uma redução na mobilidade do esperma de *C. gigas*, acentuada consoante o decréscimo de pH, *i.e* quando expostos ao pH 7,7, os espermatozóides apresentaram um ligeiro decréscimo de actividade e velocidade, tornando-se mais agudo em pH 7,4. Contrariamente ao observado neste trabalho, Havenhand e Schlegel (2009) não detectaram alterações significativas, entre um pH de 8,1 e 7,8, na velocidade de natação dos espermatozóides da ostra *C. gigas*, colhidas na costa oeste da Suécia. No entanto, Havenhand *et al.* (2008), evidenciam o decréscimo de actividade do esperma do ouriço-do-mar *Heliocidaris erythrogramma* quando exposto a um pH de 7,7 pela redução da velocidade do esperma em 11,7% e da mobilidade do esperma em 16,3%, em comparação com um pH de 8,1. Apesar de não se tratar de um bivalve, confirma-se a perturbação da actividade dos gâmetas masculinos num organismo calcificador. Esta observação pode ser explicada pelo facto de as membranas biológicas serem extremamente permeáveis ao CO₂ (Gutknecht *et al.*, 1977), causando a entrada directa no ovo ou no espermatozóide decrescendo o pH intracelular comprometendo a mobilidade do esperma, a fecundação do ovo e o seu desenvolvimento (Kurihara, 2008b).

Em relação à taxa de fecundação (fig. 3.6), verificou-se que o pH 7,7 reduz a taxa de fecundação da ostra *C. gigas* em cerca de 10% e o pH 7,4 reduz a taxa de fecundação em 50%. Este resultado vai ao encontro do que foi observado na mobilidade do esperma, sugerindo que a acidez poderá ter influenciado a viabilidade dos espermatozóides e consequentemente a capacidade de penetrar nos ovócitos. No entanto, apesar de não ter sido analisado o efeito do pH sobre os ovócitos, supõe-se que a acidez também actue sobre estes. O decréscimo da taxa de fecundação foi comprovado por Parker *et al.* (2009), na ostra *Saccostrea glomerata*, onde foi detectado um decréscimo significativo da fecundação com o aumento do pCO₂ (até 1000ppm, equivalente ao pH 7,6). No estudo de Parker *et al.* (2009) foi também evidenciado o efeito do aumento de temperatura em simultâneo com a acidificação, confirmando o decréscimo da fecundação entre 18-30°C. Em contraste, outros estudos não confirmam o decréscimo de fecundação de *C. gigas* com o aumento de acidez (Havenhand e Schlegel, 2009, e Kurihara *et al.*, 2007). Ambos os parâmetros foram estudados apenas durante o ensaio sobre o efeito da acidificação na fecundação e o desenvolvimento larvar.

4.2 Taxa de Eclosão Larvar

Durante o ensaio sobre o efeito da acidificação no desenvolvimento larvar verificou-se que a taxa de eclosão larvar de *C. gigas* (fig. 3.1), 36 horas após fecundação, é mais elevada nos tratamentos do que no controlo e atribui-se estes valores a um erro de amostragem, nomeadamente durante o processo de homogeneização anterior à recolha das amostras. De acordo com pesquisas recentes, nenhum outro estudo comprova o aumento da taxa de eclosão com o aumento da acidez.

No ensaio sobre o efeito da acidificação na fecundação e no desenvolvimento larvar (fig. 3.7), verifica-se um decréscimo da taxa de eclosão com o aumento de acidez do meio. Esta variável foi medida 48 horas após fecundação e em média, a taxa de eclosão no pH 7,7 teve um ligeiro decréscimo de $6\pm 7,7\%$ e o pH 7,4 teve um decréscimo de $16\pm 3\%$. Apesar de não ter sido possível analisar estatisticamente estes valores dado o baixo número de amostras, nos últimos anos têm sido publicados artigos que validam significativamente a hipótese de decréscimo da taxa de eclosão num meio acidificado, por exemplo, Kurihara *et al.* (2007) demonstram o decréscimo de larvas eclodidas no pH 7,4 (água do mar subsaturada em relação à aragonite, $\Omega_{\text{ARG}}=0,68$) para *C. gigas*, assim como Kurihara *et al.* (2008a) para o mexilhão *Mytillus galloprovincialis*. Mais recentemente, Gazeu *et al.* (2010) demonstraram que o pH 7,8 não altera significativamente a taxa de eclosão do mexilhão *M. edulis*, mas um decréscimo de 24% na taxa de eclosão foi detectado para o pH de 7,5 ($\Omega_{\text{ARG}}=0,81$). Os resultados obtidos e os diversos trabalhos publicados, confirmam que a taxa de eclosão sofra perturbações a partir de um pH de 7,5, para os bivalves estudados.

4.3 Mortalidade Larvar

Para o ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar, não se confirmou a influência do pH sobre a taxa de mortalidade larvar (fig. 3.2). Neste ensaio, todos os tratamentos se desenvolvem de forma relativamente equivalente, com a taxa de mortalidade crescente ao longo do ensaio. Ao fim de 252 horas de ensaio (11 dias), todos os tratamentos se aproximaram de 100% de mortalidade, deixando de existir condições para manter o ensaio. O condicionamento de larvas de moluscos é um processo extremamente sensível e uma cultura poderá tornar-se inviável devido a uma ligeira alteração no sistema de incubação ou da qualidade inicial dos gâmetas. No entanto, em condições semelhantes a este ensaio, Beesley *et al.* (2008), demonstram a degradação dos lisossomas de juvenis de *M. edulis*, relatando o aumento da porosidade, aumento da permeabilidade dos substratos e a activação de enzimas hidrolíticas latentes (que pode levar à morte celular e à redução da condição biológica geral do indivíduo).

No que se refere ao ensaio sobre o efeito da acidificação na fecundação e no desenvolvimento larvar, demonstrou-se o efeito negativo da acidificação na taxa de mortalidade média (fig. 3.8). A evolução da mortalidade larval é distinta entre os tratamentos, com maior agravamento no pH 7,4, evidenciando que as larvas velíferas anormais (ver subcapítulo seguinte) se tornem frágeis na

coluna de água, resultando na sua degradação e no seu desaparecimento ao longo do ensaio. No entanto a taxa de mortalidade média é maior ao longo do ensaio do que a taxa de velígeras anormais, o que sugere também alguma sensibilidade das larvas velígeras normais possivelmente ao nível metabólico ou morfométrico, uma vez que a produção da prodissoconcha num meio subsaturado em relação à aragonite requererá um *input* de energia maior e mais desgastante para a larva, prejudicial para a sua orientação e *fitness*. No entanto, dada a ausência de dados não é possível inferir se houve ou não subsaturação de aragonite neste ensaio. Recentemente, Melzner *et al.* (2011) demonstraram que em situações de stress (alimento limitado e elevada $p\text{CO}_2$), o mexilhão *M. edulis* desvia a sua energia para processos mais vitais do que a conservação da concha, como a manutenção da massa somática. Dupont *et al.* (2008), evidenciam uma elevada mortalidade (próxima de 100%) do ofiurídeo *Ophiothrix fragilis* perante um pH de 7,7 num prazo de 8 dias, contrastando com 30% de mortalidade para as larvas no controlo (pH 8,1), sugerindo que esta elevada mortalidade possa ser consequência de uma fraca alimentação. Também Kurihara (2008b) faz referência ao facto de quanto menor for a larva, mais susceptível estará à inanição.

4.4 Larvas Velígeras Anormais

Ao longo do ensaio sobre o efeito da acidificação no desenvolvimento larvar, o aumento da concentração de CO_2 no meio e o conseqüente decréscimo de pH favoreceu o aparecimento de larvas velígeras anormais (fig. 3.3), havendo um aumento na ordem dos 25 e 35% nos tratamentos de pH 7,7 e 7,4, respectivamente, às 84 horas após fecundação (ao fim de três dias e meio). Como já foi referido, deduz-se que o padrão de decréscimo da taxa de velígeras anormais se deva à inviabilidade das larvas anormais na coluna de água e resultando na morte. Kurihara *et al.* (2007 e 2008a) confirmam este aumento de larvas velígeras anormais na ostra *C. gigas* e no mexilhão *M. galloprovincialis*, quando expostas a um pH de 7,4. Em relação à morfologia das larvas velígeras anormais (tabela 4.1), destaca-se o pH como impulsionador de anomalias na concha e protuberâncias do manto. Em relação às anomalias na concha, verificou-se sobretudo irregularidades na margem dorsal da larva, assimetria e fissuras na prodissoconcha sugerindo algumas deficiências no processo de calcificação. Estas anormalidades foram observadas em ambos os tratamentos de pH 7,7 e 7,4, no entanto no pH 7,4 notou-se um agravamento destas deformações. Está documentada a redução da capacidade de biomineralização de moluscos e equinodermes devido ao elevado $p\text{CO}_2$ e ao baixo pH associado (e.g. Keyplas *et al.*, 2006; Gazeu *et al.*, 2007; Kurihara *et al.*, 2007 e 2008a; Dupont *et al.*, 2008; Brennand *et al.*, 2010; Kroeker *et al.*, 2010). Considera-se que estas mudanças na morfologia da larva se devam a uma das duas hipóteses: (a) à incapacidade da larva produzir ACC suficiente para uma concha forte que a proteja do meio ou (b) da rápida dissolução da concha devido ao meio corrosivo. Em relação à protuberância do manto, verificou-se também uma maior incidência desta particularidade nas larvas expostas ao pH 7,4 (onde o $p\text{CO}_2$ é mais elevado, cerca de 2000ppm). Esta deformação do manto poderá dever-se ao fenómeno de hipercapnia, *i.e.* o aumento da $p\text{CO}_2$ no meio poderá estar a influenciar a pressão dentro da larva e provocar a expulsão parcial do manto. Ou poderá dever-se a um processo de calcificação incompleto, com falhas no transporte proteico de Ca^{2+}

como sugere Kurihara (2008b), no entanto este fenómeno não estão ainda devidamente documentados. Esta protuberância parece ocorrer somente nas primeiras 36h após fecundação, estipulando-se que esta particularidade torne a larva inviável. Mesmo que a mobilidade da larva não tenha sido avaliada neste ensaio, põe-se a hipótese de esta alteração no manto prejudicar a mobilidade da larva na coluna de água e comprometer a sua sobrevivência (Kurihara *et al.*, 2008a).

A taxa de larvas velígeras anormais no ensaio sobre o efeito da acidificação na fecundação e no desenvolvimento larvar, apresentada na figura 3.9, apresenta uma distinção entre os três tratamentos em estudo, no entanto a análise estatística apenas confirma o efeito do pH 7,4. A morfologia das larvas velígeras (tabela 4.5) ocorreram também ao nível de deformações da concha e protuberâncias do manto, mas verificou-se que estas irregularidades foram mais intensas neste ensaio. O que leva a crer que as células ectodérmicas no embrião, responsáveis pela posterior mineralização da concha fiquem danificadas impedindo a natural segregação do CaCO_3 . Apesar de os resultados não serem claros em relação a alterações directas na síntese de CaCO_3 ou se a concha foi dissolvida pelo CO_2 , suspeita-se que ocorram ambos os fenómenos tal como mencionado em Kurihara *et al.* (2007). Durante a observação das larvas velígeras ao microscópio ao longo do ensaio foi evidente o aumento da intensidade das deformações consoante o decréscimo de pH, em contraste com o crescimento saudável das larvas velígeras do controlo. A concha torna-se frágil, quebradiça e atrofiada e o manto torna-se saliente nas primeiras 48 horas após a fecundação. As deduções feitas para esta variável no ensaio anterior são igualmente aplicáveis neste ensaio.

4.5 Crescimento Larvar

No ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar, verificou-se que apenas o pH 7,4 influi sobre o crescimento larvar (fig. 3.4 e 3.5), provocando a sua redução na taxa de crescimento. O tratamento com pH 7,7 mantém-se muito próximo do controlo. Para reforçar este resultado, foi detectado em juvenis de *Mytilus spp.* a ausência de intervenção do pH 7,7 e a redução da taxa de crescimento de juvenis, impulsionado pelo pH (e.g. Berge *et al.*, 2006, significância a partir do pH 7,4 e Michaelidis *et al.*, 2005, significância a partir do pH 7,5). Brennand *et al.* (2010) relatam a influência negativa do pH e da temperatura no crescimento da larva do ouriço-do-mar *Tripneustes gratila*.

No entanto, durante o ensaio do efeito da acidificação na fecundação e no desenvolvimento larvar confirmou-se a influência negativa de ambos os tratamentos acidificados no crescimento das larvas velígeras de *C. gigas* (fig. 3.10 e 3.11), sugerindo que a exposição dos gametas sexuais a um meio de pH intermédio possa limitar o futuro desenvolvimento da larva. O decréscimo acentuado do crescimento larvar, devido à exposição ao pH 7,4 já foi documentado em *C. gigas* (Kurihara *et al.*, 2007) e em *M. galloprovincialis* (Kurihara *et al.*, 2008a). Tem sido demonstrado que o decréscimo da taxa de crescimento durante os estádios iniciais de desenvolvimento dos organismos marinhos afecta a viabilidade do estágio juvenil, reduzindo a capacidade competitiva e

aumentando a mortalidade dos indivíduos após a fixação (Anil *et al.*, 2001; Gazeu *et al.*, 2010). Considera-se que a redução da taxa de crescimento das larvas de *C. gigas* poderá comprometer a sua viabilidade.

5. CONCLUSÃO

Compreender o papel do oceano no ciclo global do carbono é crítico para a nossa capacidade de prever a resposta do planeta em relação ao actual aumento do CO₂ atmosférico (Barker *et al.*, 2003). Cerca de 44% da população mundial vive na costa (Nganyi *et al.*, 2010) e depende activamente dos animais marinhos como fonte de subsistência, pelo que estudar a resposta biológica destas espécies é crucial para prever alterações drásticas nas pescas e na aquacultura. Os resultados revelaram uma elevada sensibilidade da larva velígera de *C. gigas* a baixos níveis de pH. No geral, foram encontradas diferenças entre os pH na mobilidade do esperma, taxa de fecundação, sobrevivência, crescimento e ocorrência de prodissoconchas anormais e protuberância do manto. O impacto do pH 7,4 na fecundação e viabilidade larvar é maior do que o impacto do pH 7,7.

Uma vez que a fase larvar é relativamente semelhante em todos os bivalves existe uma forte probabilidade de este fenómeno afectar outras espécies da mesma família e até mesmo da mesma ordem ou filo, apesar dos trabalhos com bivalves adultos revelarem uma grande variabilidade inter e intraespecífica nas respostas à acidificação por CO₂. Assim, no futuro o papel dos moluscos apresenta um desafio à dinâmica dos ecossistemas marinhos. Adaptações ao meio serão uma possibilidade apesar de ainda não haver registos e suspeita-se que a escala temporal do agravamento da acidificação seja bastante menor do que o período necessário ao ajustamento dos organismos ao novo ambiente. Os resultados deste estudo sugerem que o sucesso de reprodução e os mecanismos biológicos de calcificação são interrompidos prematuramente quando expostos a um meio acidificado e influenciam a viabilidade da larva velígera de *C. gigas* comprometendo a sua sobrevivência. É essencial investigar o impacto da acidificação impulsorada pelo CO₂ sobre a embriogénese e o desenvolvimento larvar inicial porque são fases extremamente delicadas e essenciais para manter a população dos taxa dos invertebrados marinhos. Tal como refere Dupont *et al.* (2008), a extinção não exige a morte instantânea de todos os indivíduos de uma espécie. Um decréscimo de 1% em cada geração pode reduzir a população animal a densidades insustentáveis, em menos de um século.

6. CONSIDERAÇÕES FUTURAS

Tendo em conta os ensaios experimentais efectuados, considera-se que teria sido um bom contributo um terceiro ensaio que investigasse as taxas de fecundação em cada tratamento e se prolongasse até ao final da fase de velígera. Seria importante também analisar a variação do comportamento da *C. gigas* a longo prazo, realizar um estudo aprofundado ao nível metabólico e de síntese proteica durante o estado larvar, para um conhecimento mais aprofundado dos efeitos fisiológicos e bioquímicos da acidificação nos estados larvares e estudar o comportamento de bivalves quando expostos à interacção entre o fenómeno de acidificação com o aumento da temperatura do oceano.

No entanto, um trabalho dependente dos *timings* biológicos dos organismos (e.g. desova) encontra sempre alguma barreira em relação à maturação do organismo. Estas funções biológicas estão dependentes das condições do meio em que os indivíduos se encontram e podem antecipar-se ao esperado ou acontecer tardiamente, o que pode condicionar os prazos do tempo de trabalho.

Este estudo focou-se numa das espécies estuarino-lagunares mais características da costa portuguesa. No entanto seria interessante ampliar o estudo a outras espécies do mesmo género (*Crassostrea*) para se comparar o desempenho entre espécies mas também a outras espécies de bivalves da costa portuguesa de elevado valor comercial, como a amêijoia-macha, amêijoia-branca, amêijoia-boia, conculha, lingueirão, entre outros.

REFERÊNCIAS

- Abril, G., Borges, A. V. (2004). *Carbon dioxide and methane emissions from estuaries*, in: Greenhouse Gas Emissions: Fluxes and Processes. Hydroelectric Reservoirs and Natural Environments. Environmental Science Series, Springer-Verlag, 187–207pp.
- Anil, A.C., Desai, D., Khandeparker, L. (2001). *Larval development and metamorphosis in Balanus amphitrite Darwin (Cirripedia; Thoracica): significance of food concentration, temperature and nucleic acids*, Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, Vol(263), 125–141pp.
- Archer, D. (2005). *The fate of fossil fuel CO₂ in geologic time*. Journal of Geophysical Research Vol (110), C09S05, doi:10.1029/2004JC002625.
- Atkinson, M., Cuet, P. (2008) *Possible effects of ocean acidification on coral reef biogeochemistry: Topics for research*. Marine Ecology Progress Series Vol(373), 249-256pp.
- Assmann, K., Boden, T., Bonan, G., Bopp, L., Buitenhuis, E. *et al.* (2010), *Carbon Budget 2009*, <http://www.globalcarbonproject.org/carbonbudget/>; 10 de Novembro de 2010.
- Barbault, R., 1994. *Baleias, Bactérias e Homens*. Instituto Piaget, 296pp.. ISBN: 972-8329-51-2
- Barker, S., Higgins, J.A., Elderfield, H. (2003). *The future of the carbon cycle: review, calcification response, ballast and feedback on atmospheric CO₂*. Philosophical Transactions of Royal Society A Vol(361), 1977-1999pp.
- Beesley, A., Lowe, D.M., Pascoe, C.K., Widdicombe, S. (2008). *Effects of CO₂-induced seawater acidification on the health of Mytilus edulis*. Climate Research Vol(37), 215-225pp.
- Berelson, W.M., Balch, W.M., Najjar, R., Feely, R.A., Sabine, C., Lee, K. (2007). *Relating estimates of CaCO₃ production, export, and dissolution in the water column to measurements of CaCO₃ rain into sediment traps and dissolution on the sea floor: a revised global carbonate budget*. Global Biogeochemical Cycles, Vol(21), GB1024, doi:10.1029/2006GB002803
- Berge, J., Bjerkeng, B., Pettersen O., Schaaning, M.T., Øxnevad, S. (2006) *Effects of increased sea water concentrations of CO₂ on growth of the bivalve Mytilus edulis L.* Chemosphere Vol(62), 681-687pp.
- Bernstein, L., Bosch, P., Canziani, O., Chen, Z., Crist, R., *et al.* (2007). *Climate Change 2007: Synthesis Report. Summary for Policymakers*, 22pp.
- Bindoff, N.L., Willebrand, J., Artale, V., Cazenave, A., Gregory, J. *et al.* (2007). Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level, in: Solomon, S., Qin, D., *et al.* (eds.) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 48pp.
- Brennand H. S., Soars, N., Dworjanym S. A., Davis, A. R., Byrne, M. (2010) *Impact of ocean warming and ocean acidification on larval development and calcification in the sea urchin Tripneustes gratilla*. PLoS ONE Vol(5):e11372. Doi:10.1371/journal.pone.0011372.
- Caldeira, K., Wickett, M. (2003). *Anthropogenic carbon and ocean pH*. Nature Vol(425) 365pp.
- Canadell, J., Quéré, C., Raupach, M., Field, C., Buitenhuis, E., *et al.* (2007). *Contributions to accelerating atmospheric CO₂ growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks*. Proceedings of the National Academies of Sciences Vol(104), 18866-18870pp.
- Christo, S.W., Absher, T.M. (2008) *Crescimento da prodissoconcha de ostras do género Crassostrea sacco, 1897 (Bivalvia, Ostreidae)*. Boletim do Instituto de Pesca Vol(34), 71-77pp.

Chen, C., Borges, A. (2009). *Reconciling opposing views on carbon cycling in the coastal ocean: Continental shelves as sinks and near-shore ecosystems as sources of atmospheric CO₂*. Deep-Sea Research II Vol(56), 578-590pp.

Csirke, J. (2005). *Global Production and State of Marine Fishery Resources* in: Review of the State of World Marine Fishery Resources. FAO Fisheries Technical Paper 457

Denman, K.L., Brasseur, G., Chidthaisong, A., Ciais, P., Cox, P.M., *et al.* (2007). Couplings Between Changes in the Climate System and Biogeochemistry, in: Solomon, S., Qin, D., *et al.* (eds.) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 90pp.

Doney, S., Tilbrook, B., Roy, S., Metzl, N., Quéré, C., *et al.* (2009a). *Surface-ocean CO₂ variability and vulnerability*. Deep-Sea Research II Vol(56), 504-511pp.

Doney, S., Fabry, V., Feely, R., Kleyplas, J., (2009b). *Ocean Acidification: The Other CO₂ Problem*. Annual Reviews of Marine Science Vol (1), 169-192pp.

Dupont, S., Havenhand, J., Thorndyke, W., Peck, L., Thorndyke, M. (2008) *Near-future level of CO₂-driven ocean acidification radically affects larval survival and development in the brittlestar Ophiothrix fragilis*. Marine Ecology Progress Series Vol(373), 285-294pp.

EPA (2006). Chapter 11: pH and Alkalinity, in: *Voluntary Estuary Monitoring Manual: A Methods Manual*, EPA-842-B-06-003, http://water.epa.gov/type/oceb/nep/upload/2009_03_13_estuaries_monitor_chap11.pdf; 18 de Julho de 2011

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

Fabry, V.J., McClintock, J.B., Mathis, J.T., Grebmeier, J.M. (2009) *Ocean acidification at high latitudes: The bellwether*. Oceanography Vol(22), 160-171pp.

FAO (2011). *Species Fact Sheet: Crassostrea gigas*, <http://www.fao.org/fishery/species/3514/en>; 12 de Julho de 2011.

Feely, R.A., Sabine, C.L., Lee, K., Berelson, W., Kleypas, J., *et al.* (2004). *Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans*. Science, Vol(305), 362-66pp.

Feely, R.A. (2008). *Present and Future Changes of the Carbonate System in the Global Oceans*. 2nd Symposium on the Ocean in a High-CO₂ World, PDF.

Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., *et al.* (2007). Changes in Atmospheric Constituents and in Radiative Forcing, in: Solomon, S., Qin, D., *et al.* (eds.) *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 106pp.

Gangstø, R., Joos, F., Gehlen, M. (2011) *Sensitivity of pelagic calcification to ocean acidification*. Biogeosciences Vol(8), 433-458pp.

Garcia, R. (2004). *Sobre a Terra – Um guia para quem lê e escreve sobre ambiente*. 2^a Ed. PÚBLICO – Comunicação Social, SA. ISBN 972-8179-85-5 190-201pp.

Gaspar, M. (1996). *Bivalves do Litoral Oceânico Algarvio. Aspectos da Biologia, Ecologia e da Pescaria dos Mananciais de interesse Económico: Aplicação à gestão de Recursos*. Tese de Doutoramento. Universidade do Algarve, Faro, 282pp.

Gattuso, J.-P., Hansson, L., *et al.* (2009). *European Project on Ocean Acidification (EPOCA). Objectives, Products, and Scientific Highlights*. Oceanography Vol. 22, 12pp.

- Gazeu, F., Quiblier, C., Jansen, J.M., Gattuso, J.-P., Middleburg, J.J., *et al.* (2007) *Impact of elevated CO₂ on shellfish calcification*. Geophysical Research Letters, Vol(34), L07603, doi:10.1029/2006GL028554.
- Gazeau, F., Gattuso, J.-P., Dawber, C., Pronker, A. E., Peene, F., Peene, J., *et al.* (2010) *Effect of ocean acidification on the early life stages of the blue mussel Mytilus edulis*, Biogeosciences Vol(7), 2051-2060pp., doi:10.5194/bg-7-2051-2010
- Goldston, D. (2008) *Getting it Across*, Nature, Vol(454), 16, doi:10.1038/454016a.
- Gutknecht, J., Bisson M. J., Tosteson, F. C. (1977). *Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers*. The Journal of General Physiology Vol, 69, 779-794pp.
- Havenhand, J. N., Buttler, F. R., Thorndyke, M. C., Williamson, J. E. (2008). *Near-future levels of ocean acidification reduce fertilization success in a sea urchin*. Current Biology Vol. 18, R651–R652.
- Havenhand, J. N., Schlegel, P. (2009). *Near-future levels of ocean acidification do not affect sperm motility and fertilization in the oyster Crassostrea gigas*. Biogeosciences Vol. 6, 3009-30115pp, doi:10.5194/bg-6-3009-2009.
- Heip, C.H.R. (2007); *Marine biodiversity*. http://www.eoearth.org/article/Marine_biodiversity; 11 de Novembro de 2010.
- Helm, M., Bourne, N., Lovatelli, A. (2004). *Hatchery culture of bivalves. A practical manual*. FAO Fisheries Technical Paper. No. 471. Rome, FAO. 177p.
- Héral, M., Deslous-Paoli, J. (1991). Oyster Culture in European Countries, in: Menzel, W. (ed) *Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture*, CRC Press, Florida, 153-190pp.
- Ho, M. (2006). *Oceans Carbon Sink or Source*. Disponível em: <http://www.isis.org.uk/OceanCarbonSink.php>; 5 de Dezembro de 2010.
- Holmen, K. (2000). *The global carbon cycle*. In: Jacobson M.C., Charlson R.J., *et al.* (eds) *Earth system science: biogeochemical cycles to global change*, International Geophysics Volume(72), 282-321pp.
- IMBER (2008). *History of IMBER*. Disponível em: <http://www.imber.info/history.html>; 15 de Novembro de 2010.
- IMBER (2010). *Join IMBER/SOLAS Carbon Research Working Group*. Disponível em: http://www.imber.info/C_WG.html; 15 de Novembro de 2010.
- Iwata K. (1980). *Mineralization and architecture of the larval shell of Haliotis discus hannai Ino, (Archaeogastropoda)*. Journal of the Faculty of Science Hokkaido University serie IV, Vol(19), 305–320pp.
- Joaquim, S., Matias, D., Moreno O. (2008). *Cultivo de bivalvos en criadero / Cultivo de bivalves em maternidade*. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera – Consejería de Agricultura y Pesca, 84pp. ISBN: 978-84-8474-252-4
- Kleypas, J.A., Feely, R.A., Fabry, V.J., Langdon, C., Sabine, C.L. *et al.* (2006). *Impacts of ocean acidification on coral reefs and other marine calcifiers: a guide for future research, report of a workshop held 18-20 April 2005, St. Petersburg*. Patrocinado por NSF, NOAA e o US Geological Survey, 96pp.
- Kniprath, E. (1981). *Ontogeny of the molluscan shell field: a review*. Zoologica Scripta, Vol(10), 61–79pp.

- Kroeker, K.J., Kordas, R.L., Crim, R.N., Singh G.G. (2010) *Meta-analysis reveals negative yet variable effects of ocean acidification on marine organisms*. Ecology Letters Vol(13), 1419-1434pp.
- Kurihara, H., Kato, S., Ishimatsu, A. (2007). *Effects of increased seawater pCO₂ on early development of the oyster Crassostrea gigas*. Aquatic Biology Vol(1), 91-98pp.
- Kurihara, H., Asai, T., Kato, S., Ishimatsu, A. (2008a). *Effects of elevated pCO₂ on early development in the mussel Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Biology Vol(4), 225-233pp.
- Kurihara, H. (2008b) *Effects of ocean acidification on developmental stages of invertebrates*. Marine Ecology Progress Series vol(373), 275-284pp.
- Kuroyanagi, A., Kawahata, H., Suzuki, A., Fugita, K., Irie, T. (2009) *Impacts of ocean acidification on large benthic foraminifers: results from laboratory experiments*. Marine Micropaleontology Vol(73), 190-195pp.
- Massoud, Z. (1992). *Terra Viva*. Instituto Piaget, 392pp. ISBN: 972-8245-48-3
- McConnaughey, T. A., Gillikin, D.P. (2008). *Carbon isotopes in mollusk shell carbonates*. Geo-Marine Letters Vol(28), 287-299pp.
- Melzner F., Stange P., Trübenbach K., Thomsen J., Casties I., et al. (2011). *Food Supply and Seawater pCO₂ Impact Calcification and Internal Shell Dissolution in the Blue Mussel Mytilus edulis*. PLoS ONE Vol(6): e24223. doi:10.1371/journal.pone.0024223
- Michaelidis, B., Ouzounis, C., Paleras, A., Pörtner, H.-O. (2005) *Effects of long-term moderate hypercapnia on acid-base balance and growth rate in marine mussels Mytilus galloprovincialis*. Marine Ecology Progress Series Vol(293), 109-118pp.
- Miller, A. W., Reynolds, A. C., Sobrino, C., Riedel G.F. (2009). *Shellfish face uncertain future in high CO₂ World: Influence of acidification on oyster larvae calcification and growth in Estuaries*. PLoS ONE Vol(4): e5661, 8pp. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0005661
- Mucci A. (1983). *The solubility of calcite and aragonite in seawater at various salinities, temperatures, and one atmosphere total pressure*. American Journal of Science, Vol(283), 780-99pp.
- NASA (2010a). *The Carbon Cycle. Carbon on the land and in the oceans: the modern carbon cycle*. Earth Observatory. Disponível em http://earthobservatory.nasa.gov/Features/CarbonCycle/carbon_cycle3.php; 6 de Janeiro, 2011.
- Nganyi, J., Akrofi, J., Farmer, T. (2010) *Human Settlement on the Coast: The even more popular coasts*. Disponível em <http://www.oceansatlas.org/servlet/CDSServlet?status=ND0xODc3JjY9ZW4mMzM9KiYzNz1rb3M~>; 20 de Julho, 2011.
- Nybakken, J. W. (2001). *Marine Biology: An Ecological Approach*. Benjamin Cummings, São Francisco, 500pp. ISBN 0-321-03076-1
- Ocean Acidification Network, 2010. Disponível em <http://www.ocean-acidification.net/>; 4 de Outubro de 2010.
- Oliveira, A., Cabeçadas, G., Pilar-Fonseca, T. (2011) *Iberia Coastal Ocean in the CO₂ Sink/Source Context: Portugal Case Study*. Journal of Coastal Research In-Press.
- Orr, J.C., Fabry, V.J., Aumont, O., Bopp, L., Doney S.C., et al. (2005). *Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms*. Nature, Vol(437|29), doi:10.1038/nature04095

Parker, L.M., Ross, P.M., O'Connor, W.A. (2009) *The effect of ocean acidification and temperature on the fertilization and embryonic development of the Sydney rock oyster Saccostrea glomerata (Gould 1850)*. Global Change Biology Vol(15), 2123-2136 pp.

Pörter, H.O., Langebuch, M., Reipschlag, A. (2004) *Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and earth history*. Journal of Oceanography Vol(60), 705-718 pp.

Range, P., Chicharo, M. A., Ben-Hamadou, R., Piló, D., Matias, D., et al. (2010). *Calcification, growth and mortality of juvenile clams Ruditapes decussatus under increased pCO₂ and reduced pH: Variable responses to ocean acidification at local scales?* Journal of Experimental Marine Biology and Ecology Vol(396), 177-184 pp.

Raupach, M., Canadell, J., Quéré, C., (2008). *Increasing CO₂ airborne fraction*. Biogeosciences Discussions Vol(5), 2867–2896pp.

Raven, J., Caldeira, K., Elderfield, H., Hoegh-Guldberg, O., Liss, P., et al. (2005). *Ocean acidification due to increasing atmospheric carbon dioxide*. The Royal Society, 68pp.. ISBN 0 85403 617 2

Ringwood, A. H., Keppler, C. J. (2002). *Water Quality Variation and Clam Growth: Is pH Really a Non-issue in Estuaries?* Estuaries Vol(25), 901-907pp.

Sabine, C. L., Feely, R. A., Gruber, N., Key, R. M., Lee, K., et al. (2004). *The Oceanic Sink for Anthropogenic CO₂*. SCIENCE Vol(305), 367-371pp.

Scripps CO₂ Program (2011). *Charles David Keeling Biography*, http://scrippsco2.ucsd.edu/sub_program_history/charles_david_keeling_biography.html; 21 de Novembro de 2010.

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., et al. (2007). *Climate Change 2007: The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. New York: Cambridge Univ. Press

Tans, P., Keeling, R. (2011). *Trends in Atmospheric Carbon Dioxide*, http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/#mlo_full; 30 de Junho de 2011; 17 de Fevereiro de 2011.

Takahashi, T., Sutherland, S., Wanninkhof, R., Sweeney, C., Feely, R., et al. (2009). *Climatological mean and decadal change in surface ocean pCO₂, and net sea-air CO₂ flux over the global oceans*. Deep-Sea Research II Vol(56), 554-577pp.

Tyrell, T. (2011). *Future extinction for Ehux?*, <http://www.noc.soton.ac.uk/soes/staff/tt/eh/future.html>; 20 de Março de 2011.

Wei, G., McCulloch, M.T., Mortimer, G., Deng, W., Xie, L. (2009). *Evidence for ocean acidification in the Great Barrier Reef of Australia*. Elsevier, Geochimica et Cosmochimica Acta Vol(73), 2332-2346 pp.

Weiss, I., Tuross, N., Addadi, L., Weiner, S. (2002). *Mollusc Larval Shell Formation: Amorphous Calcium Carbonate is a Precursor Phase for Aragonite*. Journal of experimental Zoology Vol(293), 478-491pp.

Wong, G. T. (1979) *Alkalinity and pH in the southern Chesapeake Bay and the James River estuary*. Limnology and Oceanography, Vol(24), 970–977pp.

Zardus, J., Martel, A. (2002). *Phylum Mollusca: Bivalvia*. In: *Atlas of Marine Invertebrate Larvae*” Cap.15. Editora Academic, California, 289-326pp. ISBN: 0-12-773141-5

Zeebe, R. (2009) *Marine carbonate chemistry*. Disponível em: http://www.eoearth.org/article/Marine_carbonate_chemistry; 20 de Outubro de 2010.

ANEXOS

Tabela A.1 Contagem do número de indivíduos em desenvolvimento embrionário parado, larvas trocóforas, larvas velígeras “D” normais e anormais, 36 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁					Controlo ₂					Controlo ₃				
	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	225000	350000	890000	40000	1505000	90000	330000	565000	5000	990000	75000	190000	785000	55000	1105000
2	380000	250000	885000	50000	1565000	210000	280000	780000	5000	1275000	75000	240000	770000	45000	1130000
3	(a)	350000	790000	35000	1175000	80000	280000	780000	0	1140000	40000	205000	755000	25000	1025000
Média	302500	316667	855000	41667	1415000	126667	296667	708333	3333	1135000	63333	211667	770000	41667	1086667

Amostra	pH 7,7 ₁					pH 7,7 ₂					pH 7,7 ₃				
	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	100000	220000	490000	395000	1205000	135000	145000	890000	55000	1225000	115000	100000	810000	40000	1065000
2	95000	90000	365000	120000	670000	100000	120000	925000	60000	1205000	110000	180000	835000	55000	1180000
3	215000	100000	445000	(a)	760000	95000	120000	930000	50000	1195000	100000	130000	750000	70000	1050000
Média	136667	136667	433333	257500	878333	110000	128333	915000	55000	1208333	108333	136667	798333	55000	1098333

Amostra	pH 7,4 ₁					pH 7,4 ₂					pH 7,4 ₃				
	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	205000	100000	615000	285000	1205000	145000	145000	550000	170000	1010000	150000	205000	575000	345000	1275000
2	145000	140000	805000	250000	1340000	95000	85000	410000	110000	700000	120000	70000	525000	305000	1020000
3	140000	135000	(a)	370000	645000	105000	90000	510000	140000	845000	130000	95000	520000	360000	1105000
Média	163333	125000	710000	301667	1063333	115000	106667	490000	140000	851667	133333	123333	540000	336667	1133333

(a) – *outlier*; este valor não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.2 Taxa de eclosão larvar, 36 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Valor Médio Total de Larvas Velígeras "D"	896667	8116667	711667	690833	970000	853333	1011667	630000	876667
Numero Total de Ovos Fecundados	1415000	1086666	1135000	878333	1208333	1098333	1063333	851667	1133333
Taxa de Eclosão Larvar (%)	63,37	74,69	62,70	78,65	80,28	77,69	95,14	73,97	77,35

Tabela A.3 Taxa de Velígeras “D” Anormais e Normais, 36 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Valor Médio Total de Larvas Velígeras “D”	896667	8116667	711667	690833	970000	853333	1011667	630000	876667
Taxa de Larvas Velígeras “D” Anormais (%)	4,65	5,13	0,47	37,27	5,67	6,45	29,82	22,22	38,40
Taxa de Larvas Velígeras “D” Normais (%)	95,35	94,87	99,53	62,73	94,33	93,55	70,18	77,78	61,60

Tabela A.4 Taxa de Larvas Trocóforas (%), Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 36 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Larvas Trocóforas (%)	26,10	20,68	29,42	16,52	11,68	13,80	11,00	14,48	12,33
Taxa de Sobrevivência (%)	85,75	94,17	88,84	94,21	90,90	90,14	106,90	86,50	88,24
Taxa de Mortalidade (%)	14,25	5,83	11,16	5,79	9,10	9,86	-6,90*	13,50	11,76

* - considerado zero, no tratamento estatístico

Tabela A.5 Comprimento (μm) e Altura (μm), 36 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	81,6	73,3	83,5	70,2	76,7	63
2	84,4	68,8	81,6	68,5	79,5	65,7
3	83,3	73,7	77,8	68,3	84,7	71,7
4	85,2	74,8	80,6	69,2	83,9	68,2
5	86,5	70,7	88,6	74,3	80,1	65,9
6	83,1	70	82,8	69,5	83,9	71,4
7	83,2	69,5	85,2	64,6	73,6	65,9
8	81,1	68,8	81,6	63,8	85,2	71,1
9	83,1	69,8	89,4	64,9	81	69
10	81,8	69,7	83,4	69,9	74,6	63,9
11	86,9	69,6	84,3	61	84,6	70,2
12	84,2	69,8	76,8	57,8	-	-
13	87,8	72,3	78,5	68,9	-	-
14	89,5	70,1	81,8	70,4	-	-
15	83,3	67,6	83,4	65,4	-	-
16	83,6	69,9	82,9	67,9	-	-
17	84,9	69,2	79,2	64,9	-	-
18	83,3	71,9	83,9	61,3	-	-
19	81,1	71,4	81	68,2	-	-
20	84,2	65,9	81,9	71,4	-	-
21	83,8	73	90,7	71,8	-	-
22	84,5	70,8	84,4	63,8	-	-
23	83,2	69,6	87,9	73,7	-	-
24	85,2	69,5	89,2	70	-	-
25	84,1	68,1	74,8	61	-	-
26	81,9	73,5	87,6	66,5	-	-
27	87	71,7	82,3	68,3	-	-
28	81,6	70,9	83,7	70	-	-
29	82	69	80	71,3	-	-
30	85,9	71,1	80,8	69,5	-	-
Média	84,0	70,5	83,0	67,5	80,7	67,8

Indivíduos	pH 7,7 ₁		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	81,3	70,8	78,3	69,0	86,2	76,7
2	81,1	67,4	82,0	72,8	84,6	68
3	82,9	69,3	78,2	70,5	82,6	68,7
4	81,8	67,3	82,7	70,4	85,0	72,7
5	78,5	60,6	80,1	68,7	73,5	63,7
6	76,9	59,6	80,5	71,3	67,3	56,8
7	78,5	64,4	80,6	68,6	78,2	65,5
8	80,0	68	80,3	70,7	78,9	66,2
9	78,8	66,1	88,0	70,3	72,2	63,6
10	82,3	61,9	78,6	64,6	81,8	66,9
11	88,2	71,9	86,6	71,4	81,7	69,9
12	81,2	67,1	82,0	69,3	83,2	72,4
13	80,0	73,1	85,1	68,2	82,6	72,1
14	80,1	68	81,4	69,6	83,5	68,2
15	85,4	71,2	80,3	71,5	83,1	64,4
16	76,6	67,3	79,7	68	81,3	67,8
17	82,0	69,4	81,9	69,6	80,9	69,1
18	77,7	67,9	83,5	71,5	81,4	66,6
19	86,0	66,1	80,0	69,7	85,7	72,6
20	80,6	62,8	82,8	68,9	83,6	71,6
21	78,2	66,9	79,3	69,7	82,3	67,5
22	76,3	67,5	79,5	71,9	79,6	70,5
23	82,8	73,5	81,3	69,3	88,6	75,2
24	77,4	67,4	83,7	70,6	82,8	71,9
25	76,7	70,2	78,2	67,9	80,8	72,6
26	83,8	70,2	82,3	71,8	85,6	70,2
27	84,2	62,1	85,6	67,3	80,8	67,6
28	77,9	65,8	86,9	71,5	85,4	71,8
29	82,9	70,1	80,0	68,2	86,1	71,4
30	85,2	64,4	87,3	71,9	65,9	58,4
Média	80,8	67,3	81,9	69,8	81,2	68,7

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	75,1	57,0	68,5	64,9	77,8	65,8
2	79,4	64,3	72,0	65,0	72,9	64,5
3	70,5	56,5	68,3	58,1	74,2	65,9
4	77,2	56,7	66,0	60,1	68,8	62,5
5	74,7	62,9	71,4	65,7	74,8	67,6
6	66,1	60,8	69,6	61,6	70,3	60,5
7	68,5	56,1	69,2	59,1	77,7	67,0
8	72,6	64,9	82,5	65,0	71,2	60,6
9	69,3	63,0	68,1	54,8	76,5	61,6
10	74,9	60,6	70,7	64,9	74,8	62,0
11	72,4	58,3	71,5	63,4	76,4	63,0
12	78,4	63,9	70,3	62,1	71,9	58,6
13	70,8	59,1	73,2	64,6	82,4	66,8
14	78,2	68,0	70,4	60,6	64,6	56,9
15	67,8	64,0	70,2	63,8	79,9	64,4
16	75,1	64,6	72,0	58,8	67,8	59,1
17	81,6	65,4	76,4	62,5	69,9	61,5
18	75,6	65,0	85,0	67,3	72,6	64,0
19	74,7	55,8	72,9	63,7	70,3	62,3
20	75,1	68,0	77,4	61,5	72,4	62,3
21	77,3	65,3	75,7	64,9	71,5	61,3
22	80,1	67,1	71,0	62,9	69,9	59,0
23	78,9	68,3	64,5	49,6	74,5	62,1
24	70,4	62,9	81,3	66,6	72,9	60,5
25	76,6	72,1	64,5	59,2	82,8	67,8
26	64,5	46,7	74,2	60,9	73,2	63,5
27	80,6	65,1	77,6	67,1	60,7	55,0
28	71,6	62,8	68,4	59,3	71,2	63,0
29	75,7	65,9	80,9	71,0	69,7	54,9
30	76,4	70,8	67,0	60,5	71,7	61,2
Média	74,3	62,7	72,4	62,3	72,8	62,2

Tabela A.6 Contagem do número de larvas velíferas “D” normais e anormais, 84 horas após fecundação, num volume de 20L para os replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁			Controlo ₂			Controlo ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	460000	225000	685000	410000	320000	730000	535000	105000	640000
2	555000	150000	705000	220000	195000	415000	570000	145000	715000
3	455000	135000	590000	120000	140000	260000	480000	100000	580000
Média	490000	170000	660000	250000	218333	468333	528333	116667	645000

Amostra	pH 7,7 ₁			pH 7,7 ₂			pH 7,7 ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	195000	375000	570000	435000	365000	800000	360000	460000	820000
2	(a)	255000	255000	310000	315000	625000	410000	395000	805000
3	180000	390000	570000	420000	380000	800000	355000	455000	810000
Média	187500	340000	465000	388333	353333	741667	375000	436667	811667

Amostra	pH 7,4 ₁			pH 7,4 ₂			pH 7,4 ₃		
	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	115000	105000	220000	55000	165000	220000	145000	310000	455000
2	75000	90000	165000	75000	175000	250000	110000	240000	350000
3	75000	(a)	75000	50000	(a)	50000	155000	265000	420000
Média	88333	97500	153333	60000	170000	173333	136667	271667	408333

(a) - *outlier*; este valor não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.7 Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 84 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Sobrevivência (%)	44,64	43,10	56,83	58,61	61,38	73,90	15,46	27,01	36,03
Taxa de Mortalidade (%)	55,36	56,90	43,17	41,39	38,62	26,10	84,54	72,99	63,97

Tabela A.8 Comprimento (μm) e Altura (μm), 84 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	86,1	73,3	79,4	72,3	82,0	66,1
2	85,4	72,7	82,5	70,0	83,4	75,8
3	90,2	76,4	86,2	69,8	86,2	72,5
4	92,5	80,7	84,8	73,7	87,7	75,0
5	88,6	76,6	95,8	77,9	85,2	72,5
6	70,7	59,4	91,9	72,2	88,6	76,4
7	89,5	78,8	89,9	78,6	93,7	77,3
8	76,3	64,3	88,2	73,1	98,6	80,2
9	76,7	65,2	86,7	76,4	87,6	80,2
10	86,2	76,9	88,8	79,4	88,6	78,2
11	81,5	68,7	92,9	78,5	92,4	79,8
12	89,2	73,8	87,7	73,3	83,9	71,2
13	92,9	81,3	82,6	71,7	91,2	75,2
14	91,5	78,8	82,6	66,5	82,8	71,9
15	93,5	78,7	86,4	76,8	82,9	70,0
16	90,2	77,5	88,4	74,1	90,3	75,1
17	83,3	73,7	84,7	74,6	90,5	78,5
18	83,9	75,9	89,4	74,9	89,2	73,4
19	86,6	75,4	84,6	74,0	88,3	81,7
20	83,3	74,8	84,7	76,5	90,0	78,3
21	90,8	76,3	89,1	71,8	87,6	76,3
22	87,9	73,4	86,1	74,9	85,4	74,1
23	83,5	67,1	88,4	77,1	91,0	78,3
24	91,9	79,0	86,7	70,7	93,3	80,3
25	92,2	81,6	89,2	76,1	89,2	75,2
26	89,1	74,5	87,8	79,5	84,6	74,3
27	84,6	76,5	86,8	72,2	83,0	76,3
28	89,1	75,4	87,0	72,1	86,4	75,7
29	89,2	75,4	86,3	73,1	94,7	77,6
30	90,1	74,2	88,3	74,4	86,2	74,7
Média	86,9	74,5	87,1	74,2	88,5	75,7

Indivíduos	pH 7,7 ₁ [*]		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	-	-	90,1	77,2	87,6	74,2
2	-	-	89,5	75,4	88,0	75,3
3	-	-	89,1	71,4	82,1	73,9
4	-	-	87,6	74,5	89,0	76,4
5	-	-	84,2	71,1	85,2	71,5
6	-	-	86,9	76,1	88,5	74,0
7	-	-	79,6	70,5	84,5	72,6
8	-	-	94,9	77,6	88,4	75,3
9	-	-	90,0	76,6	87,0	80,4
10	-	-	89,3	76,1	86,1	75,3
11	-	-	90,1	76,0	82,6	73,6
12	-	-	87,6	74,4	97,8	76,1
13	-	-	95,7	82,4	86,8	79,6
14	-	-	87,3	72,1	82,6	72,2
15	-	-	91,8	78,9	89,5	77,6
16	-	-	86,4	74,2	88,1	73,9
17	-	-	92,9	72,1	87,6	74,1
18	-	-	88,7	75,5	87,9	78,3
19	-	-	89,9	80,7	91,7	77,3
20	-	-	86,6	74,0	89,1	76,1
21	-	-	90,2	78,5	85,6	75,8
22	-	-	93,8	76,7	86,0	73,4
23	-	-	91,3	74,6	91,7	79,4
24	-	-	86,9	76,0	83,8	72,5
25	-	-	94,5	72,6	85,2	71,4
26	-	-	89,9	75,0	87,5	71,1
27	-	-	89,4	78,3	86,9	73,6
28	-	-	89,9	78,6	86,4	73,9
29	-	-	90,8	80,7	86,3	76,1
30	-	-	86,9	74,0	88,9	74,0
Média	-	-	89,4	75,7	87,3	75,0

* amostra indisponível para medição

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	75,4	64,3	75,5	64,7	75,9	68,8
2	86,4	76,7	78,3	60,9	81,0	71,0
3	78,5	72,1	84,3	71,5	70,3	64,7
4	82,8	75,5	89,1	74,4	74,5	67,6
5	76,0	66,8	84,7	70,7	77,3	68,7
6	80,3	64,1	77,8	70,0	84,1	72,1
7	83,1	70,9	82,5	74,8	82,9	70,7
8	86,0	74,5	84,9	75,5	91,0	79,0
9	88,5	73,3	85,7	72,1	81,8	75,7
10	78,8	70,5	74,9	64,2	81,9	76,1
11	83,4	75,8	68,9	57,7	66,7	57,2
12	-	-	77,5	64,9	84,3	74,8
13	-	-	82,5	66,5	80,1	70,8
14	-	-	87,7	71,6	80,7	65,6
15	-	-	89,4	70,6	84,1	72,1
16	-	-	73,1	63,0	81,5	70,7
17	-	-	78,6	68,8	84,9	71,6
18	-	-	79,8	66,9	88,9	74,2
19	-	-	75,5	61,2	80,3	67,6
20	-	-	79,8	63,0	75,3	68,0
21	-	-	77,8	67,6	71,9	65,1
22	-	-	84,7	75,0	75,5	69,3
23	-	-	77,0	70,7	81,8	70,2
24	-	-	87,9	70,5	76,1	68,0
25	-	-	75,7	63,3	72,4	66,3
26	-	-	76,1	70,5	75,2	66,2
27	-	-	78,2	68,1	81,9	66,4
28	-	-	70,0	62,0	79,4	68,4
29	-	-	77,9	65,3	82,5	75,4
30	-	-	80,5	64,6	88,2	75,5
Média	81,7	71,3	79,9	67,7	79,7	69,9

Tabela A.9 Contagem do número de larvas velígeras “D” normais e anormais, 132 horas após fecundação, num volume de 20L para os replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁			Controlo ₂			Controlo ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	285000	80000	365000	(a)	10000	10000	500000	70000	570000
2	205000	40000	245000	125000	20000	145000	465000	125000	590000
3	280000	30000	310000	110000	55000	165000	430000	80000	510000
Média	256667	50000	306667	117500	28333	106667	465000	91667	556667

Amostra	pH 7,7 ₁			pH 7,7 ₂			pH 7,7 ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	110000	215000	325000	215000	50000	265000	285000	210000	495000
2	135000	220000	355000	170000	85000	255000	385000	230000	615000
3	150000	260000	410000	205000	70000	275000	390000	220000	610000
Média	131667	231667	363333	196667	68333	265000	353333	220000	573333

Amostra	pH 7,4 ₁			pH 7,4 ₂			pH 7,4 ₃		
	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	25000	50000	75000	80000	55000	135000	125000	140000	265000
2	40000	25000	65000	45000	45000	90000	85000	130000	215000
3	70000	25000	95000	65000	60000	125000	70000	165000	235000
Média	45000	33333	78333	63333	53333	116667	93333	145000	238333

(a) - *outlier*; este valor não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.10 Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 132 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Sobrevivência (%)	20,74	13,42	49,05	40,37	21,93	52,20	6,52	13,70	21,03
Taxa de Mortalidade (%)	79,26	86,58	50,95	59,63	78,07	47,80	93,48	86,30	78,97

Tabela A.11 Comprimento (μm) e Altura (μm), 132 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	90,1	78,8	87,9	72,1	91,2	80,5
2	87,2	75,6	87,9	76,9	97,2	85,3
3	87,9	73,4	87,9	82,1	88,5	73,7
4	91,1	78,2	89,7	78,3	84,3	77,9
5	90,1	77,4	95,8	76,1	88,9	75,8
6	94,0	78,8	87,3	78,5	80,5	72,9
7	90,8	79,9	90,1	81,2	90,7	77,0
8	85,4	76,1	85,5	75,2	94,3	74,7
9	89,1	78,5	91,2	78,0	90,3	76,8
10	86,8	76,6	85,4	74,2	87,0	78,1
11	95,6	79,7	88,9	74,6	90,1	78,5
12	89,5	77,3	90,6	77,2	98,9	80,8
13	88,2	74,7	86,1	79,0	88,1	70,1
14	87,8	78,7	80,1	73,0	85,4	79,3
15	97,3	83,0	84,5	73,8	88,5	76,9
16	86,4	73,5	91,2	78,6	89,2	78,6
17	87,1	77,7	91,4	80,2	88,4	68,7
18	90,3	81,1	94,4	79,5	87,7	77,5
19	92,0	80,8	87,6	77,8	92,7	76,0
20	88,7	75,3	86,3	73,2	84,3	75,4
21	89,4	67,0	86,8	74,7	84,8	72,9
22	84,8	65,5	83,8	73,6	88,5	75,2
23	86,0	67,9	91,2	76,5	91,6	79,2
24	84,3	74,4	91,0	70,7	86,0	77,2
25	89,9	74,8	93,2	78,6	86,2	79,1
26	90,2	77,4	90,5	77,6	92,6	77,1
27	91,4	76,7	88,4	75,4	82,3	69,7
28	90,6	78,6	96,8	82,9	89,7	77,4
29	95,0	80,9	90,0	76,9	84,6	75,4
30	84,2	71,7	87,0	75,7	89,3	73,7
Média	89,4	76,3	89,0	76,7	89,4	76,4

Indivíduos	pH 7,7 ₁		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	84,7	76,9	86,7	75,5	86,4	73,2
2	87,6	74,7	84,2	70,0	89,6	78,9
3	86,7	72,1	90,0	81,2	86,6	73,9
4	82,0	69,3	92,0	79,4	91,2	79,2
5	73,7	64,4	91,3	76,6	88,2	75,3
6	86,6	68,9	90,7	80,3	83,9	70,2
7	84,7	71,4	90,3	78,9	88,4	82,4
8	90,1	73,9	89,3	78,8	88,4	79,5
9	84,3	67,2	89,1	74,4	82,6	74,6
10	88,8	77,8	88,6	75,7	92,2	75,7
11	84,7	71,9	86,5	76,8	97,1	78,9
12	84,8	62,9	87,2	78,8	87,1	76,6
13	86,5	74,6	88,8	77,5	92,8	76,1
14	82,2	66,6	97,5	82,4	79,1	72,9
15	88,7	79,0	84,1	73,9	81,7	75,2
16	87,0	76,0	88,0	76,0	87,1	79,3
17	88,0	76,3	90,0	75,7	85,2	72,8
18	84,4	62,4	89,1	74,0	88,6	75,8
19	92,0	66,4	89,4	69,1	84,3	71,1
20	98,3	77,2	90,6	73,7	78,2	69,8
21	87,0	68,8	82,0	68,8	93,8	77,0
22	84,0	76,8	90,4	76,6	80,6	67,1
23	89,3	70,7	94,1	84,1	89,8	81,6
24	94,1	74,8	88,4	76,1	85,7	75,9
25	96,3	78,4	89,2	79,8	85,8	73,2
26	91,3	65,3	91,3	76,9	87,6	73,3
27	82,6	74,2	90,2	83,0	90,4	79,3
28	88,4	75,1	87,3	78,9	85,3	75,4
29	87,3	64,6	94,2	81,2	90,8	81,2
30	84,1	69,1	91,7	78,5	95,1	82,1
Média	87,0	71,6	89,4	77,1	87,5	75,9

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	90,4	81,5	82,6	69,6	95,7	82,7
2	86,3	70,1	81,5	67,0	80,5	69,2
3	84,2	74,6	87,6	74,4	94,6	77,2
4	87,6	75,8	80,7	69,7	86,2	78,3
5	82,4	64,7	76,8	63,4	82,0	70,2
6	87,8	76,0	81,2	63,8	81,1	69,3
7	79,8	68,8	82,9	64,9	81,3	71,1
8	87,2	67,9	77,1	68,2	85,8	67,2
9	83,2	65,9	71,0	59,1	80,8	68,0
10	90,1	74,5	77,4	71,3	82,4	66,6
11	86,4	75,3	77,9	68,3	86,9	75,1
12	85,0	69,7	77,1	67,1	86,6	76,3
13	84,4	73,3	83,3	71,6	89,7	77,8
14	81,0	70,3	75,7	66,3	84,6	78,0
15	83,6	71,7	83,0	72,8	75,8	62,8
16	80,8	66,2	78,3	72,7	82,8	68,5
17	86,3	72,6	90,4	79,4	84,6	79,3
18	82,9	74,5	83,6	71,9	94,8	76,0
19	79,3	70,3	88,8	77,8	94,4	76,2
20	84,7	66,5	90,8	81,3	82,6	67,8
21	85,3	75,2	87,7	77,3	84,1	70,1
22	87,5	75,4	91,5	76,7	83,1	77,2
23	89,4	67,3	76,4	70,5	79,8	72,5
24	83,7	68,4	72,9	62,5	84,3	73,5
25	82,7	73,8	77,8	70,8	90,3	72,1
26	81,0	67,7	78,3	66,6	82,6	68,3
27	83,9	69,3	75,2	63,0	80,3	72,9
28	80,8	72,3	82,0	70,9	83,2	72,5
29	83,1	76,3	77,2	65,2	81,1	72,8
30	88,2	79,5	73,3	65,7	86,4	74,9
Média	84,6	71,8	80,7	69,7	84,9	72,8

Tabela A.12 Contagem do número de larvas velíferas “D” normais e anormais, 180 horas após fecundação, num volume de 20L para os replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁			Controlo ₂			Controlo ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	185000	25000	210000	125000	25000	150000	495000	30000	525000
2	130000	40000	170000	70000	15000	85000	355000	40000	395000
3	160000	40000	200000	80000	(a)	85000	315000	45000	360000
Média	158333	35000	193333	91667	20000	106667	388333	38333	426667

Amostra	pH 7,7 ₁			pH 7,7 ₂			pH 7,7 ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	135000	130000	265000	315000	45000	360000	385000	125000	510000
2	160000	100000	260000	265000	55000	320000	380000	120000	500000
3	75000	95000	170000	305000	100000	405000	375000	105000	480000
Média	123333	108333	231667	295000	66667	361667	380000	116667	496667

Amostra	pH 7,4 ₁			pH 7,4 ₂			pH 7,4 ₃		
	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	30000	15000	45000	45000	45000	90000	115000	50000	165000
2	35000	10000	45000	20000	20000	40000	(a)	60000	130000
3	20000	(a)	25000	35000	15000	50000	170000	105000	275000
Média	28333	12500	38333	33333	26667	60000	142500	71667	190000

(a) - *outlier*; este valor não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.13 Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 180 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Sobrevivência (%)	13,08	10,28	37,59	25,74	29,93	45,22	3,40	7,05	18,90
Taxa de Mortalidade (%)	86,92	89,72	62,41	74,26	70,07	54,78	96,60	92,95	81,10

Tabela A.14 Comprimento (μm) e Altura (μm), 180 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	92,7	82,5	85,6	74,8	86,9	75,4
2	90,0	75,3	87,9	77,7	91,2	79,7
3	92,8	84,3	92,0	80,5	89,4	76,4
4	88,8	71,3	88,4	82,2	91,6	80,2
5	88,6	77,4	89,2	78,4	89,2	77,7
6	87,6	77,1	86,8	78,0	88,9	78,8
7	89,4	75,9	86,4	75,5	87,1	74,2
8	94,1	79,1	89,0	74,2	86,6	76,5
9	88,6	77,5	89,7	76,1	87,6	78,6
10	92,6	78,4	91,9	79,0	86,8	79,1
11	92,3	83,1	89,8	75,8	93,4	82,6
12	91,1	77,0	90,8	76,9	88,6	80,8
13	86,7	77,1	86,3	79,9	87,6	74,2
14	93,0	80,8	88,3	73,4	86,8	69,2
15	89,2	80,2	91,1	79,1	91,2	78,8
16	89,7	79,6	87,9	76,8	90,1	77,8
17	97,7	78,6	92,2	79,3	93,8	80,9
18	91,1	75,8	89,7	75,4	91,2	82,0
19	92,4	78,4	92,1	77,4	88,0	74,0
20	90,1	81,4	87,4	77,7	85,4	74,5
21	86,9	78,1	94,0	80,1	91,6	79,5
22	87,1	73,9	87,9	77,7	90,9	82,6
23	89,5	80,3	86,5	76,1	83,0	75,5
24	91,9	82,5	91,2	81,0	95,2	83,8
25	88,0	77,4	93,5	82,1	91,9	80,7
26	88,7	77,2	92,7	79,9	86,0	75,4
27	87,5	82,2	86,5	73,2	93,5	80,1
28	90,6	80,9	85,4	73,5	93,3	81,7
29	93,6	80,2	91,0	80,2	91,4	77,7
30	91,8	81,2	94,7	79,4	87,7	82,9
Média	90,5	78,8	89,5	77,7	89,0	78,4

Indivíduos	pH 7,7 ₁		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃ *	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	92,9	73,9	85,3	76,0	-	-
2	87,5	68,2	95,8	78,2	-	-
3	91,2	75,4	89,2	76,9	-	-
4	84,6	75,0	91,1	79,6	-	-
5	98,5	80,5	84,3	73,5	-	-
6	91,9	74,8	89,2	72,4	-	-
7	84,6	75,1	99,4	84,2	-	-
8	85,6	75,8	83,1	68,7	-	-
9	89,9	77,5	86,9	76,0	-	-
10	84,1	75,8	92,7	79,3	-	-
11	85,2	64,4	88,6	76,6	-	-
12	95,1	80,1	89,4	77,2	-	-
13	82,8	74,7	90,7	75,9	-	-
14	88,6	77,4	90,6	77,0	-	-
15	87,7	72,5	88,8	77,5	-	-
16	92,6	75,1	96,3	80,2	-	-
17	85,3	75,4	89,5	81,5	-	-
18	86,3	71,7	90,8	78,4	-	-
19	91,0	76,6	93,0	82,9	-	-
20	86,9	81,3	92,5	78,8	-	-
21	82,4	72,3	87,5	73,3	-	-
22	82,7	71,3	90,3	78,8	-	-
23	81,6	77,2	85,3	74,3	-	-
24	84,3	75,1	91,7	81,0	-	-
25	89,9	79,3	91,0	75,8	-	-
26	93,0	75,4	87,7	79,3	-	-
27	86,9	80,2	90,1	69,3	-	-
28	85,8	76,9	86,3	77,4	-	-
29	85,4	71,0	92,5	77,9	-	-
30	90,9	80,6	93,6	79,4	-	-
Média	87,8	75,4	90,1	77,2	-	-

* amostra indisponível para medição

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	85,1	72,7	89,2	81,8	77,6	67,6
2	94,7	85,4	88,7	77,2	87,9	75,2
3	88,6	74,6	90,3	77,5	80,7	73,1
4	83,9	71,4	73,3	69,3	89,7	67,3
5	82,4	74,4	80,5	68,3	91,7	78,0
6	84,3	75,4	88,6	77,1	76,1	67,3
7	85,4	74,4	97,6	85,1	84,0	66,6
8	88,9	80,2	92,0	77,9	82,1	69,8
9	72,9	64,8	91,6	77,8	75,3	66,7
10	73,0	64,9	87,9	65,2	85,7	71,2
11	87,1	78,0	90,7	78,5	77,6	67,4
12	86,0	75,0	91,2	81,6	83,5	76,1
13	84,1	75,5	84,2	77,9	83,5	73,5
14	82,1	77,3	86,3	70,7	87,3	79,8
15	84,6	73,0	81,1	70,5	78,1	69,7
16	82,7	70,0	78,4	69,5	90,0	77,5
17	86,9	73,0	94,7	81,6	80,7	74,1
18	86,0	71,6	73,0	68,0	89,1	74,9
19	86,4	75,7	85,2	71,1	84,9	75,1
20	81,7	72,1	93,1	83,2	81,1	71,8
21	95,1	78,1	79,7	71,2	88,5	73,8
22	84,9	75,6	84,7	76,1	81,7	76,8
23	86,2	76,2	84,1	74,1	97,5	79,9
24	87,2	77,2	93,7	81,9	75,9	68,2
25	82,1	70,6	77,1	64,0	74,2	63,0
26	80,8	70,2	80,9	72,5	93,6	77,3
27	87,1	75,5	91,0	73,9	78,5	66,1
28	85,8	71,0	78,7	67,1	83,2	74,3
29	87,6	75,4	81,3	69,5	86,0	75,9
30	81,3	71,2	76,4	66,8	87,5	70,6
Média	84,8	74,0	85,5	74,2	83,8	72,3

Tabela A.15 Contagem do número de larvas velíferas “D” normais e anormais, 252 horas após fecundação, num volume de 20L para os replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁			Controlo ₂			Controlo ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	50000	0	50000	10000	0	10000	45000	0	45000
2	30000	0	30000	10000	5000	15000	15000	15000	30000
3	(a)	(a)	20000	15000	0	15000	65000	10000	75000
Média	40000	0	33333	11667	1667	13333	41667	8333	50000

Amostra	pH 7,7 ₁			pH 7,7 ₂			pH 7,7 ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	40000	15000	55000	45000	0	45000	65000	20000	85000
2	45000	15000	60000	110000	10000	120000	35000	15000	50000
3	(a)	15000	25000	95000	0	95000	30000	20000	50000
Média	42500	15000	46667	83333	3333	86667	43333	18333	61667

Amostra	pH 7,4 ₁			pH 7,4 ₂			pH 7,4 ₃		
	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	5000	0	5000	15000	5000	20000	50000	25000	75000
2	15000	0	15000	15000	5000	20000	40000	10000	50000
3	0	0	0	0	0	0	(a)	15000	25000
Média	6667	0	6667	10000	3333	13333	45000	16667	50000

(a) - *outlier*; este valor não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.16 Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 252 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Sobrevivência (%)	2,71	1,23	4,41	6,39	7,17	5,61	0,55	1,57	5,44
Taxa de Mortalidade (%)	97,29	98,77	95,59	93,61	92,83	94,39	99,45	98,43	94,56

Tabela A.17 Comprimento (μm) e Altura (μm), 252 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	91,5	79	90,6	78,9	88,4	75,4
2	91,4	72	89,3	76,8	86,0	74,2
3	91,1	85	92,6	80,7	90,6	79,7
4	91,8	74	84,4	70,0	91,5	81,3
5	88,2	75	81,0	75,4	85,8	78,3
6	90,8	77	85,2	78,6	80,6	73,2
7	87,7	80	81,9	71,1	92,1	77,8
8	87,7	79	88,0	77,8	95,2	82,5
9	86,8	75	88,3	77,8	90,8	80,5
10	89,2	79	-	-	94,1	81,6
11	86,2	75	-	-	87,9	75,6
12	87,6	81	-	-	87,6	75,9
13	88,4	75	-	-	86,0	75,4
14	89,2	76	-	-	91,5	78,9
15	87,6	77	-	-	89,3	80,6
16	87,6	77	-	-	88,4	78,9
17	95,3	82	-	-	89,2	76,7
18	94,1	79	-	-	89,4	80,2
19	90,5	81	-	-	89,6	81,3
20	86,6	82	-	-	85,9	79,8
21	88,6	78	-	-	92,7	82,0
22	88,0	78	-	-	86,4	79,8
23	91,3	81	-	-	87,9	72,7
24	84,2	79	-	-	90,7	81,2
25	86,3	79	-	-	89,2	81,8
26	95,0	79	-	-	88,7	77,1
27	92,2	78	-	-	89,4	80,0
28	94,0	83	-	-	91,2	79,1
29	82,0	76	-	-	89,0	77,1
30	91,4	80	-	-	89,2	80,4
Média	89,4	78	86,8	76,3	89,4	78,6

Indivíduos	pH 7,7 ₁ [*]		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	-	-	93,4	80,9	84,6	76,3
2	-	-	91,0	81,3	89,4	76,1
3	-	-	95,8	82,5	90,2	78,4
4	-	-	92,1	77,5	86,6	76,2
5	-	-	92,8	79,3	86,7	77,9
6	-	-	91,0	80,0	79,0	74,2
7	-	-	91,5	82,2	96,8	82,8
8	-	-	86,6	75,0	90,2	81,5
9	-	-	87,7	76,1	91,0	78,9
10	-	-	91,7	77,2	89,3	78,6
11	-	-	92,1	77,9	83,7	74,5
12	-	-	91,2	80,3	92,8	80,9
13	-	-	90,3	82,1	92,3	81,1
14	-	-	80,1	71,1	87,7	74,6
15	-	-	88,2	80,6	83,0	72,6
16	-	-	85,7	81,8	81,4	67,2
17	-	-	82,0	67,5	95,8	73,1
18	-	-	94,4	76,7	88,2	71,1
19	-	-	89,4	71,6	90,9	79,5
20	-	-	94,2	85,1	93,6	84,1
21	-	-	93,2	77,2	87,9	77,4
22	-	-	87,1	79,3	85,2	71,2
23	-	-	89,2	80,0	92,5	84,8
24	-	-	89,1	76,8	91,0	76,9
25	-	-	87,9	80,9	84,3	78,8
26	-	-	89,7	77,3	89,2	80,3
27	-	-	92,5	81,5	93,8	82,3
28	-	-	94,4	81,8	81,5	65,5
29	-	-	92,9	80,7	89,4	79,9
30	-	-	88,4	80,3	82,9	62,4
Média	-	-	90,2	78,8	88,4	76,6

* amostra indisponível para medição

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	84,1	76,1	88,8	77,5	79,0	72,1
2	91,9	76,9	85,4	74,2	83,0	73,2
3	81,5	73,3	90,3	76,3	73,3	67,1
4	82,3	73,3	83,9	70,9	90,5	66,6
5	88,9	79,5	77,0	69,8	81,8	70,2
6	80,4	73,4	82,5	70,3	86,0	78,0
7	88,2	75,4	89,1	73,3	81,8	74,3
8	82,5	70,9	90,9	78,5	74,5	64,5
9	83,9	70,7	92,6	82,2	86,5	74,9
10	88,8	82,2	84,6	74,9	78,9	69,3
11	87,6	77,7	90,7	78,2	79,0	70,7
12	-	-	83,2	73,5	81,8	73,0
13	-	-	86,1	69,7	81,3	75,4
14	-	-	79,9	64,1	81,0	70,8
15	-	-	82,4	74,5	82,4	75,8
16	-	-	74,5	69,1	88,6	76,8
17	-	-	73,7	65,1	82,1	71,0
18	-	-	92,5	81,8	92,8	83,1
19	-	-	81,6	74,8	84,9	74,8
20	-	-	81,1	72,4	77,8	69,4
21	-	-	92,4	83,2	82,3	68,7
22	-	-	76,3	71,3	79,7	72,5
23	-	-	80,3	71,6	81,0	71,3
24	-	-	82,8	74,3	78,7	71,2
25	-	-	91,0	79,6	80,8	69,8
26	-	-	80,4	65,8	95,2	80,4
27	-	-	77,9	68,7	80,6	67,3
28	-	-	88,0	75,0	86,9	69,8
29	-	-	88,6	75,0	91,8	73,4
30	-	-	84,2	71,5	86,8	65,0
Média	85,5	75,4	84,4	75,1	83,0	71,0

Tabela A.18 Contagem do número de indivíduos em desenvolvimento embrionário parado, larvas trocóforas, larvas velíferas “D” normais e anormais, 48 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁					Controlo ₂					Controlo ₃				
	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	0	0	225000	25000	250000	5000	5000	35000	20000	65000	25000	15000	320000	10000	370000
2	15000	0	290000	45000	350000	0	0	55000	10000	65000	25000	20000	305000	25000	375000
3	10000	0	225000	40000	275000	0	0	25000	30000	55000	35000	45000	445000	15000	540000
Média	8333	0	246667	36667	291667	1667	1667	38333	20000	61667	28333	26667	356667	16667	428333

Amostra	pH 7,7 ₁					pH 7,7 ₂					pH 7,7 ₃				
	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	0	5000	(a)	30000	(a)	0	0	85000	160000	245000	10000	0	25000	60000	95000
2	0	0	50000	25000	75000	15000	0	90000	145000	250000	0	0	30000	85000	115000
3	0	0	55000	(a)	(a)	15000	0	115000	(a)	130000	10000	0	15000	75000	100000
Média	0	1667	52500	27500	75000	10000	0	96667	152500	208333	6667	0	23333	73333	103333

Amostra	pH 7,4 ₁					pH 7,4 ₂					pH 7,4 ₃				
	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Desenv. Embr. Parado	Larvas Trocóforas	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	60000	35000	95000	150000	340000	75000	10000	70000	245000	400000	150000	45000	305000	490000	990000
2	60000	(a)	85000	190000	335000	95000	10000	95000	295000	495000	100000	45000	215000	510000	870000
3	45000	30000	(a)	110000	(a)	(a)	20000	60000	205000	285000	195000	70000	190000	545000	1000000
Média	55000	32500	90000	150000	337500	85000	13333	75000	248333	393333	148333	53333	236667	515000	953333

(a) – *outlier*; este valor não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.19 Taxa de eclosão larvar, 48 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Valor Médio Total de Larvas Velígeras "D"	283333	58333	373333	80000	249167	96667	240000	323333	751667
Numero Total de Ovos Fecundados	291667	61667	428333	75000	208333	103333	337500	393333	953333
Taxa de Eclosão Larvar (%)	97,14	94,59	87,16	106,67	119,60	93,55	71,11	82,20	78,85

Tabela A.20 Taxa de Velígeras “D” Anormais e Normais, 48 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Valor Médio Total de Larvas Velígeras “D”	283333	58333	373333	80000	249167	96667	240000	323333	7516667
Taxa de Larvas Velígeras “D” Anormais (%)	12,94	34,29	4,46	34,38	61,20	75,86	62,50	76,80	68,51
Taxa de Larvas Velígeras “D” Normais (%)	87,06	65,71	95,54	65,63	38,80	24,14	37,50	23,20	31,49

Tabela A.21 Taxa de Larvas Trocóforas (%), Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 48 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Larvas Trocóforas (%)	0,0	2,78	6,67	2,04	0,0	0,0	11,93	5,10	6,63
Taxa de Sobrevivência (%)	97,14	97,30	93,39	108,89**	119,60**	93,55	80,74	85,59	84,44
Taxa de Mortalidade (%)	2,86	2,70	6,61	-8,89*	-19,60*	6,45	19,26	14,41	15,56

* - considerado zero, no tratamento estatístico

** - considerado cem, no tratamento estatístico

Tabela A.22 Comprimento (μm) e Altura (μm), 48 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	88,0	74,5	85,2	70,4	83,4	72,3
2	84,1	72,4	87,5	72,5	83,4	71,7
3	85,2	71,7	82,1	73,0	87,2	73,7
4	89,2	76,2	88,0	76,4	82,3	69,8
5	86,6	70,2	82,9	71,4	87,3	75,9
6	84,3	72,0	88,4	73,5	87,1	74,3
7	79,0	67,7	88,0	73,2	87,7	75,3
8	84,4	72,6	85,8	71,3	88,9	73,8
9	89,8	75,3	89,2	77,3	83,8	74,0
10	85,4	73,4	85,2	69,0	86,2	75,2
11	88,5	72,8	74,4	65,6	83,6	71,9
12	89,1	73,8	82,6	69,3	87,0	67,2
13	86,1	70,9	87,6	72,7	86,1	74,6
14	88,0	74,5	86,2	72,2	84,3	70,0
15	85,5	71,8	90,2	70,1	87,3	72,2
16	87,6	75,6	88,3	75,2	87,8	74,3
17	85,1	70,8	77,6	66,1	84,7	70,6
18	88,5	71,8	87,6	71,5	88,0	74,5
19	82,8	69,9	87,0	72,3	84,7	70,6
20	85,1	70,9	80,7	62,0	87,5	71,5
21	86,6	69,4	82,8	74,0	88,4	71,7
22	85,8	72,7	86,1	74,0	86,9	72,9
23	84,7	69,3	87,7	72,2	91,4	76,9
24	88,3	73,2	81,7	65,4	82,7	69,7
25	87,5	74,6	89,1	74,1	92,1	74,4
26	85,6	72,4	81,9	68,1	85,7	70,7
27	85,4	73,9	86,0	71,2	84,7	71,8
28	85,0	71,6	84,5	72,2	89,5	74,1
29	84,1	72,1	85,9	70,4	85,1	71,7
30	87,7	72,4	89,3	72,7	88,2	73,8
Média	86,1	72,3	85,3	71,3	85,5	72,7

Indivíduos	pH 7,7 ₁		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	81,2	61,7	81,5	58,0	70,6	61,2
2	74,1	63,8	86,0	75,7	84,2	71,9
3	74,2	60,6	83,3	59,1	81,7	68,7
4	84,7	70,4	81,3	72,7	75,0	65,1
5	82,6	64,7	82,5	61,0	78,1	61,7
6	79,6	62,6	89,4	72,4	81,9	68,8
7	82,2	66,2	86,3	69,7	69,9	56,2
8	79,9	67,4	83,6	63,0	71,9	56,8
9	80,2	66,6	88,4	67,9	67,7	58,8
10	74,2	68,0	83,2	74,8	80,9	72,2
11	84,3	67,5	66,9	56,8	83,1	64,4
12	76,9	62,9	83,8	71,4	73,4	59,8
13	80,0	67,2	64,8	52,2	80,3	65,1
14	77,7	66,8	81,5	69,6	80,8	68,4
15	72,2	58,5	84,4	58,1	77,9	68,2
16	75,8	62,4	91,1	76,1	81,2	71,2
17	81,4	67,3	86,4	70,7	89,1	70,8
18	84,5	70,6	81,1	70,3	83,9	65,9
19	76,7	67,4	86,1	72,9	80,4	66,8
20	78,8	64,7	80,3	69,3	82,5	69,3
21	82,5	70,4	80,4	69,3	86,1	69,2
22	80,7	70,8	79,5	63,1	77,8	71,4
23	79,8	68,9	84,2	63,6	79,4	63,3
24	83,3	71,6	90,5	66,6	69,6	58,8
25	80,2	68,9	87,5	67,1	79,2	62,5
26	79,0	66,6	80,9	56,9	70,6	61,8
27	76,9	65,6	82,1	69,2	71,0	57,1
28	70,8	62,0	80,0	67,6	78,8	65,3
29	71,2	61,8	82,7	72,4	73,4	62,5
30	83,2	70,3	86,8	66,5	67,7	53,8
Média	79,0	66,1	82,9	66,8	77,6	64,6

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	68,6	59,6	80,3	66,2	82,9	68,6
2	69,8	59,0	73,2	64,4	73,1	62,4
3	76,0	67,0	75,7	65,3	78,3	67,7
4	74,9	63,7	72,8	64,1	77,2	65,9
5	63,6	59,1	73,5	62,6	69,3	55,8
6	70,0	61,1	80,8	66,4	75,5	64,1
7	76,8	64,7	80,9	67,4	71,1	64,7
8	73,3	65,3	81,3	68,0	76,0	64,8
9	77,3	58,9	75,9	67,8	68,1	59,2
10	58,3	50,7	80,0	69,2	77,9	63,2
11	73,8	63,6	71,1	65,2	73,9	55,7
12	76,6	61,4	83,5	72,0	74,0	60,5
13	63,6	46,9	72,1	60,9	80,8	65,8
14	77,4	65,7	66,1	57,1	72,7	66,7
15	79,2	63,3	82,4	68,8	73,4	62,8
16	74,2	64,4	80,3	65,3	74,7	65,9
17	76,6	68,0	76,4	66,6	69,6	60,9
18	78,8	65,7	76,4	59,9	72,8	57,4
19	62,5	54,5	73,2	58,7	77,7	65,2
20	69,4	58,6	72,1	62,7	74,0	59,6
21	68,0	61,4	71,3	56,7	78,0	62,9
22	63,7	58,7	68,9	58,0	81,4	71,8
23	74,2	61,7	79,4	66,0	71,7	61,7
24	72,9	63,9	70,2	50,3	74,4	61,2
25	71,8	67,2	70,6	50,9	72,7	65,1
26	75,4	65,7	79,1	65,4	82,3	65,3
27	72,6	64,5	79,3	65,6	70,7	53,7
28	70,3	57,6	75,2	62,7	76,7	64,6
29	68,8	56,4	76,2	64,9	81,8	68,3
30	72,7	60,6	70,6	63,8	76,3	64
Média	71,7	61,3	75,6	63,4	75,3	63,2

Tabela A.23 Contagem do número de larvas velíferas “D” normais e anormais, 96 horas após fecundação, num volume de 20L para os replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁			Controlo ₂ ^(b)			Controlo ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	365000	15000	380000	-	-	-	330000	20000	350000
2	385000	0	0	-	-	-	435000	15000	450000
3	385000	5000	390000	-	-	-	445000	0	0
Média	378333	6667	385000	-	-	-	403333	11667	400000

Amostra	pH 7,7 ₁			pH 7,7 ₂			pH 7,7 ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	30000	10000	40000	80000	60000	140000	25000	30000	55000
2	30000	20000	50000	90000	85000	175000	35000	35000	70000
3	55000	10000	65000	75000	100000	175000	50000	60000	110000
Média	38333	13333	51667	81667	81667	163333	36667	41667	78333

Amostra	pH 7,4 ₁			pH 7,4 ₂			pH 7,4 ₃ ^(b)		
	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	20000	50000	70000	30000	70000	100000	-	-	-
2	10000	40000	50000	(a)	65000	65000	-	-	-
3	30000	70000	100000	30000	55000	85000	-	-	-
Média	20000	53333	73333	30000	63333	83333	-	-	-

(a) – outlier, este valor não entrou para o tratamento estatístico

(b) – este tanque não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.24 Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 96 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Sobrevivência (%)	132,0**	0,00	96,89	65,96	56,65	75,81	24,04	23,05	0,00
Taxa de Mortalidade (%)	-32,00*	100,00	3,11	34,04	43,35	24,19	75,96	76,95	100,00

* - considerado zero, no tratamento estatístico

** - considerado cem, no tratamento estatístico

Tabela A.25 Comprimento (μm) e Altura (μm), 96 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	93,0	79,5	86,1	75,4	88,0	68,8
2	77,4	67,9	86,9	69,7	91,9	79,2
3	90,0	78,0	80,5	69,0	94,9	84,6
4	78,1	67,8	84,9	71,6	88,8	74,7
5	88,6	77,5	83,7	71,4	88,1	80,2
6	91,0	76,6	90,9	76,7	74,3	62,8
7	88,8	78,7	74,2	60,1	83,2	73,1
8	83,2	74,0	84,3	74,2	84,1	71,5
9	94,0	77,9	88	75,3	82,7	73,0
10	88,1	79,3	87,1	67,3	96,2	85,7
11	93,1	75,9	97	87,0	89,5	78,4
12	92,2	81,4	81,1	70,6	97,6	86,7
13	90,1	75,0	77,5	65,0	91,1	78,6
14	95,1	78,3	88,2	71,4	88,3	77,8
15	89,3	80,0	79,8	68,3	88,9	82,9
16	89,8	73,1	84,4	69,0	91,9	81,1
17	90,7	80,4	71,2	62,1	83,8	73,2
18	82,9	71,7	81,9	68,9	90,4	79,9
19	82,6	71,2	79,9	69,0	89,9	78,3
20	99,5	88,4	86,3	72,1	96,0	83,7
21	89,2	77,1	83,6	71,3	89,4	78,5
22	87,6	71,3	84,7	71,6	91,1	79,0
23	90,1	77,5	76	61,9	94,0	81,0
24	96,4	85,8	74,7	61,8	90,5	75,4
25	96,1	85,5	82	67,9	89,6	76,6
26	97,2	83,8	80,1	70,5	86,2	71,3
27	93,8	80,9	79,4	63,3	92,5	79,3
28	94,3	81,6	75,7	63,8	89,9	75,1
29	92,6	79,1	74,5	64,0	91,3	79,6
30	98,5	88,4	83,9	68,4	92,7	81,7
Média	90,4	78,1	82,3	69,3	87,4	77,7

Indivíduos	pH 7,7 ₁		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	78,0	68,3	94,2	72,9	81,5	70,4
2	81,9	69,4	97,1	76,8	79,6	69,0
3	90,0	74,2	84,4	67,4	73,2	64,7
4	78,7	68,2	82,6	69,9	78,9	64,4
5	83,2	69,4	83,0	68,0	70,8	54,9
6	85,7	65,9	82,0	68,9	75,3	63,2
7	86,3	73,3	87,1	72,2	81,6	65,8
8	81,3	71,1	93,6	71,4	76,4	67,3
9	83,9	71,3	86,1	70,7	77,5	63,4
10	61,0	48,4	81,6	69,6	76,9	68,4
11	86,5	73,9	82,4	69,3	74,7	58,5
12	87,9	71,3	87,3	70,9	69,2	59,1
13	71,2	62,6	93,4	71,8	78,1	72,1
14	75,1	61,6	93,4	71,5	80,3	59,2
15	78,5	62,9	85,3	72,5	85,4	75,5
16	79,1	59,5	81,6	69,5	80,2	61,5
17	86,1	71,6	80,4	74,8	79,0	63,8
18	83,0	72,1	81,5	65,0	69,7	60,0
19	84,3	71,6	72,5	67,6	94,4	69,2
20	81,2	64	78,8	67,1	78,1	64,5
21	90,2	74,9	93,4	81,4	68,3	60,0
22	83,3	74,8	89,9	76,1	95,3	68,8
23	88,0	70,7	79,7	66,6	78,2	65,1
24	82,6	67,4	71,8	64,1	79,4	72,2
25	84,1	72,3	90,2	77,2	73,0	62,1
26	85,5	68,7	83,5	75,6	75,4	64,8
27	78,3	66,1	90,2	75,9	67,1	57,5
28	82,3	68,3	80,0	71,5	76,6	62,1
29	81,7	70,8	85,5	74,8	79,3	68,2
30	83,8	71,5	83,4	72,9	83,6	67,3
Média	82,1	68,5	85,2	71,5	77,9	64,8

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	77,6	66,5	78,8	65,2	78,2	71,1
2	64,7	58,3	88,8	76,6	84,3	72,1
3	72,1	56,9	78,1	69,9	86,5	72,9
4	76,4	65,8	81,8	66,9	84,1	75
5	77,1	66,6	87,1	77,7	77,1	67,7
6	80,3	66,6	84,3	72,7	83,8	74,1
7	73,4	64,3	74,2	69,3	78,6	70,4
8	61,9	53,7	86,9	74,8	80,4	70,8
9	73,2	65,0	76,7	61	78,2	63,4
10	80,1	67,6	76,1	66,6	79,6	67,2
11	79,6	64,7	86,6	74,9	73,0	61,3
12	73,3	60,1	80,6	67,7	80,9	67,5
13	75,1	68,6	83,9	76	76,3	66,8
14	74,7	65,7	86,7	70,1	84,6	74,2
15	75,4	63,1	88,4	63	82,5	68,7
16	78,6	67,2	78,8	64,9	78,3	70,1
17	75,7	63,9	77,5	64,4	74,6	63,2
18	78,9	67,4	84,9	65,6	76,9	66,1
19	79,0	66,7	76,9	66,1	80,3	71,4
20	72,1	62,0	80,5	68,6	87,0	76,2
21	79,0	72,7	73,7	62,5	80,9	71,2
22	77,1	60,1	72,7	65,6	82,9	72,6
23	85,4	73,4	74,8	62,9	73,0	59,3
24	79,8	71,0	81,8	68,2	80,4	68,7
25	76,7	68,5	78,3	65,3	80,3	63,7
26	72,8	62,3	80,8	71,5	63,0	56,9
27	79,4	65,6	71,0	59,8	65,2	57,4
28	79,8	61,5	75,9	64,9	86,2	73,9
29	75,9	62,2	79,8	58,6	83,4	69,4
30	80,6	66,6	70,5	63,6	71,4	62,4
Média	76,2	64,8	79,9	67,5	79,1	62,4

Tabela A.26 Contagem do número de larvas velíferas “D” normais e anormais, 144 horas após fecundação, num volume de 20L para os replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Amostra	Controlo ₁			Controlo ₂ ^(b)			Controlo ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	295000	15000	310000	-	-	-	330000	10000	340000
2	365000	20000	385000	-	-	-	335000	10000	345000
3	375000	15000	390000	-	-	-	260000	10000	270000
Média	345000	16667	361667	-	-	-	308333	10000	318333

Amostra	pH 7,7 ₁			pH 7,7 ₂			pH 7,7 ₃		
	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total	Larvas “D” Normais	Larvas “D” Anormais	Total
1	10000	5000	15000	40000	10000	50000	10000	5000	15000
2	10000	0	10000	35000	15000	50000	10000	5000	15000
3	20000	0	20000	50000	10000	60000	10000	5000	15000
Média	13333	1667	15000	41667	11667	53333	10000	5000	15000

Amostra	pH 7,4 ₁			pH 7,4 ₂			pH 7,4 ₃ ^(b)		
	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total	Larvas "D" Normais	Larvas "D" Anormais	Total
1	10000	(a)	(a)	10000	5000	15000	-	-	-
2	0	5000	5000	20000	10000	30000	-	-	-
3	0	5000	5000	5000	5000	10000	-	-	-
Média	3333	5000	6667	11667	6667	18333	-	-	-

(a) – outlier, este valor não entrou para o tratamento estatístico

(b) – este tanque não entrou para o tratamento estatístico

Tabela A.27 Taxa de Sobrevivência Larvar (%) e Taxa de Mortalidade Larvar (%), 144 horas após fecundação, para um volume de 20L, nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

	Controlo ₁	Controlo ₂	Controlo ₃	pH 7,7 ₁	pH 7,7 ₂	pH 7,7 ₃	pH 7,4 ₁	pH 7,4 ₂	pH 7,4 ₃
Taxa de Sobrevivência (%)	124,00**	0,00	74,32	65,96	56,65	75,81	24,04	23,05	0,00
Taxa de Mortalidade (%)	-24,00*	100,00	25,68	34,04	43,35	24,19	75,96	76,95	100,00

* - considerado zero, no tratamento estatístico

** - considerado cem, no tratamento estatístico

Tabela A.25 Comprimento (μm) e Altura (μm), 96 horas após fecundação, medidos em amostras de 0,1 μL , nos replicados dos três tratamentos no ensaio do efeito da acidificação sobre a fecundação e o desenvolvimento larvar.

Indivíduos	Controlo ₁		Controlo ₂		Controlo ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	80,9	66,8	102	91,1	95,9	82,9
2	92,5	80,5	93,2	87,9	93,2	76,8
3	87,5	75,9	92,6	74,1	92,8	77,0
4	87,1	78,4	90,1	78,9	90,9	75,6
5	98,7	85,6	98,9	90,4	98,2	87,9
6	84,8	75,1	93,2	81,1	94,8	82,0
7	89,6	75,8	97,9	89,2	89,7	79,5
8	87,4	76,2	101	88,3	99,7	90,4
9	80,4	68,2	89,1	75,5	91,0	79,8
10	86,3	74,8	105,8	90,7	92,3	82,1
11	93,2	83,9	91,9	79,6	89,5	79,7
12	96,9	87,6	94,1	86,8	89,9	80,2
13	99,2	88,5	91,3	82,1	91,3	79,7
14	88,3	75,4	97,6	81,6	91,2	79,6
15	88,6	76,2	87,4	77,6	93,2	81,5
16	91,1	77,0	-	-	88,7	77,0
17	105,1	95,8	-	-	95,2	82,4
18	95,7	85,3	-	-	83,3	76,4
19	106,8	94,5	-	-	89,8	79,6
20	88,5	75,4	-	-	88,8	80,2
21	99,2	88,4	-	-	91,9	79,7
22	95,9	89,0	-	-	95,3	85,9
23	92,7	80,9	-	-	98,8	90,5
24	97,9	87,7	-	-	91,2	76,6
25	104	87,8	-	-	100,7	88,1
26	97	84,1	-	-	92,4	81,3
27	106,1	93,1	-	-	89,9	78,3
28	94,5	80,9	-	-	98,2	78,5
29	108,5	97,2	-	-	91,3	79,7
30	105,5	93,2	-	-	100,0	88,4
Média	94,3	82,6	95,1	83,7	93,5	81,2

Indivíduos	pH 7,7 ₁		pH 7,7 ₂		pH 7,7 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	81,8	68,6	87,7	78,0	84,8	74,4
2	84,9	68,9	95,6	83,4	85,8	66,6
3	81,2	64,1	87,4	70,4	82,8	74,8
4	83,9	72,2	82,6	70,1	86,7	69,4
5	83,8	68,3	84,8	73,8	70,9	65,2
6	86,4	74,4	87,2	72,8	77,0	68,7
7	84,5	73,8	85,3	70,7	76,0	65,3
8	88,2	70,7	86,7	74,7	83,6	74,6
9	83,7	63,3	83,1	70,7	76,8	68,2
10	85,3	73,7	88,9	73,5	83,9	72,4
11	82,1	67,4	85,8	70,3	80,6	69,2
12	90,8	76,7	78,7	71,6	84,2	66,6
13	76,8	65,9	86,7	76,4	96,4	88,4
14	79,6	70,0	84,1	70,4	81,8	69,2
15	86,9	74,7	91,3	78,7	75,9	62,8
16	79,2	67,0	83,6	70,2	83,6	72,3
17	82,7	69,6	81,8	73,3	77,2	64,0
18	84,1	69,6	81,5	70,1	79,6	72,7
19	83,9	69,5	85,4	71,1	82,0	69,9
20	79,6	67,6	98,8	80,1	79,8	67,6
21	82,4	69,6	87,5	76,3	83,7	65,2
22	85,4	70,4	73,6	62,3	83,7	72,9
23	78,8	65,5	91,0	75,1	84,3	74,1
24	81,9	69,5	86,9	75,6	89,9	77,7
25	80,4	64,8	89,1	78,8	80,3	72,6
26	80,0	69,8	82,1	68,2	82,7	75,4
27	90,9	76,9	87,5	74,7	85,5	71,3
28	75,7	66,6	95,3	79,5	87,1	75,2
29	76,9	66,1	90,8	79,9	79,3	69,9
30	84,6	75,3	88,8	75,7	85,4	73,7
Média	82,9	69,7	86,7	73,9	82,4	71,0

Indivíduos	pH 7,4 ₁		pH 7,4 ₂		pH 7,4 ₃	
	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura	Comprimento	Altura
1	75,5	62,0	87,3	73,9	81,0	73,4
2	79,3	67,0	86,4	78,8	88,9	76,7
3	70,3	59,8	82,6	70,2	77,9	66,6
4	71,7	60,3	76,5	66,3	78,6	67
5	75,2	68,0	77,8	68,1	79,8	69,5
6	80,5	72,6	87,4	70,5	87,9	78,8
7	74,9	66,1	93,8	81,8	92,2	80,6
8	74,9	61,6	80,9	71,1	89,5	76,2
9	79,5	66,8	72,9	61,7	75,1	64,5
10	76,1	68,2	88,8	75,9	78,3	67,1
11	84,2	64,8	81,7	70,0	89,1	78,9
12	81,5	66,0	89,1	76,9	89,4	78,3
13	85,9	71,5	82,2	72,8	93,6	81,9
14	78,9	68,2	98,5	86,8	87,9	72,1
15	77,4	64,2	96,9	86,4	83,2	69,3
16	77,9	64,4	93,8	84,1	82,3	67,5
17	84,3	66,4	84,2	72,1	91,8	79,8
18	81,6	67,5	86,6	74,6	83,8	73,4
19	84,1	71,8	90,2	74,7	79,1	70
20	74,8	57,3	80,7	71,4	83,9	72
21	84,1	70,0	81,3	70,7	87,3	73,8
22	77,2	68,9	94,8	84,9	95,9	80,3
23	72,7	65,6	85,0	73,2	81,3	69,3
24	78,6	68,4	95,1	85,5	92,1	84,3
25	73,3	62,2	81,9	69,3	91,8	80,7
26	72,1	61,4	86,9	75,5	80,0	72,8
27	74,3	63,7	80,3	69,4	80,8	69,1
28	80,5	71,4	87,9	73,9	85,7	71,5
29	77,7	64,5	72,2	64,9	88,5	77,1
30	76,2	64,3	83,9	70,9	93,0	84,6
Média	77,8	65,8	85,6	74,2	85,7	74,2