

**Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área
Ambiental – Porção Capixaba do Rio Doce e Região Marinha e
Costeira Adjacente**

A3MFRS1 – Material Suplementar 1

Anexo 3 Marinho – Fundos Recifais, Rodolitos e Macroalgas

RT-39 RRDM/FEV 22

RA2021 PMBA/FEST-RRDM

Vitória,

Fevereiro de 2021

SUMÁRIO

1. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES DE BANCOS DE RODOLITOS	3
1.1 VITALIDADE E FORMA	3
1.2 FAUNA ASSOCIADA.....	3
2. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE MACROALGAS.....	4
2.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS ALGAS CORALINÁCEAS (CALCÁRIAS) INCRUSTANTES	4
2.2 ABUNDÂNCIA DE MACROALGAS E ORGANISMOS BENTÔNICOS NA ÁREA LITORÂNEA	6
3. CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE PRESENTE NAS CAUS E MEDIÇÕES COM DATALOGGERS ASSOCIADOS	7
3.1 PROCEDIMENTO PÓS-RETIRADA DAS CAUs.....	7
3.2 COMUNIDADE DE ORGANISMOS NAS CAUs.....	7
3.3 ANÁLISE DE SEDIMENTO NAS CAUs.....	7
3.4 PRODUÇÃO DE CaCO ₃ NAS CAUs	8
3.5 TEMPERATURA E LUMINOSIDADE	8
4. CARACTERIZAÇÃO QUALI- E QUANTITATIVA DO SEDIMENTO DAS CAUS E ARMADILHAS DE SEDIMENTO	8
4.1 MINERALOGIA E GRANULOMETRIA	9
5. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA TOXICOLOGIA	9
6. CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES RECIFAIS BENTÔNICAS	9
6.1 AMOSTRAGEM QUALI-QUANTITATIVA COM FOTOQUADRADOS	9
6.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA COLUNA D'ÁGUA	10
6.3 AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO FISIOLÓGICA DE CORAIS.....	10
6.4 CARACTERIZAÇÃO DE SIMBIONTES DE CORAIS.....	11
6.4.1 Análise qualitativa e quantitativa de zooxantelas	11
6.4.2 Caracterização citométrica de zooxantelas.....	11
6.4.3 Caracterização morfológica de zooxantelas.....	11
6.4.4 Caracterização genética de zooxantelas	12
7. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES PLANCTÔNICAS ASSOCIADAS AOS FUNDOS RECIFAIS.....	14
7.1 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO PLÂNCTON	14

7.1.1	Quantificação por citometria de fluxo multiparamétrica	14
7.1.2	Diversidade citométrica.....	14
7.1.3	Análises quali- quantitativas por microscopia	15
7.2	ANÁLISE DE COMUNIDADES PLANCTÔNICAS POR IMAGEAMENTO EM FLUXO	15
7.3	ANÁLISE DE COMUNIDADES PLANCTÔNICAS EM MICROSCOPIA INVERTIDA	15
7.4	QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS.....	15
8.	ABORDAGENS ANALÍTICAS	16
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

1. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES DE BANCOS DE RODOLITOS

Para determinar a estrutura dos bancos de rodolitos serão usados quadros estáticos extraídos das filmagens (fotoquadrado) com uso de dropcamera. Serão analisados parâmetros de percentual de cobertura, densidade, vitalidade, forma e fauna e flora associada. Os parâmetros quantitativos serão analisados através da plataforma *CoralNet* (<https://coralnet.ucsd.edu/>), a qual permite automatizar classificações (=identificação dos organismos) com diferentes níveis de supervisão. O sistema utiliza um algoritmo de “*machine learning*” que reconhece padrões de cor e textura das imagens (Beijbom *et al.* 2015). Serão obtidas 5 imagens por sítio amostral, e cada imagem será processada usando 50 pontos aleatoriamente distribuídos. Parâmetros qualitativos serão analisados a partir do material coletado.

1.1 VITALIDADE E FORMA

A vitalidade dos rodolitos também será estimada a partir dos fotoquadrados. Será considerado rodolito vivo aquele cuja alga coralinácea formadora apresente pigmentação (i.e., talo róseo, vináceo, avermelhado ou com cores próximas). Serão considerados mortos os rodolitos que não apresentarem tal coloração ou que estejam com a superfície de esqueleto carbonático aparente, esbranquiçada. A partir desta metodologia, adaptada de Bahia *et al.* (2010) será calculado o percentual de cobertura de alga coralinácea viva em cada estação amostral.

O grau de esfericidade será utilizado para determinar a forma do rodolito, segundo Bosence & Pedley (1982) e Perry (2005), com base em medições dos diâmetros mínimo, intermediário e máximo de cada rodolito. Esses dados serão inseridos no programa *Tri-plot v1.3* (Graham & Midgley 2000), o qual qualifica as formas em esférica, discóide ou elipsoide, com a fórmula: $(S^2/LI)^{1/3}$, onde:

S equivale ao menor diâmetro do rodolito,

I equivale à sua medida intermediária e,

L representa sua superfície maior.

Os resultados serão expressos em valores percentuais de cada forma por estação amostral, e também graficamente através do diagrama triangular gerado pelo programa.

1.2 FAUNA ASSOCIADA

Para a análise qualitativa, os organismos presentes na superfície de cada um dos 30 rodolitos coletados por estação amostral serão separados com pinças e alicates de corte diagonal, fotografados e identificados no nível taxonômico mais específico possível, a partir da visualização de caracteres

morfoanatômicos sob microscópios estereoscópico e óptico com câmeras acopladas (Olympus SZX7 e BX 43), bem como com uso de um microscópio eletrônico de varredura (MEV) marca Zeiss (Evo 40). Adicionalmente, será analisada a composição dos organismos incrustantes no interior dos rodolitos. Para isso, rodolitos selecionados serão seccionados longitudinalmente em seu maior eixo, com o auxílio de retífica (MAKITA) e/ou microrretífica (Dremel 3000). Após a secção, os rodolitos serão lavados em água corrente e secos em estufa. A análise da estrutura interna e dos grupos de organismos que compõem cada amostra será realizada sob microscópio estereoscópico e lupa de mão. As imagens serão capturadas com o software *Scope Image Dynamic Pro*. Os principais grupos de organismos (e.g. algas coralináceas, briozoários, corais, foraminíferos e serpulídeos), inclusive bioerosores, serão identificados com base em características morfológicas e estruturais, com base em Flügel (2009). Quando necessário, amostras específicas serão enviadas a especialistas. A quantificação dos grandes grupos associados aos rodolitos será realizada através dos métodos descritos para as análises de fotoquadrados. A porcentagem de cobertura dos diferentes organismos bentônicos será avaliada quanto à variação espaço-temporal com análises de variância (ANOVA) ou outras ferramentas estatísticas uni e multivariadas.

2. IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE MACROALGAS

As macroalgas coletadas serão triadas na Base Oceanográfica da UFES com base na morfologia externa (cor, comprimento, consistência, forma de fixação e tipo de ramificação). As amostras serão acondicionadas em recipientes plásticos com formol 4% e transportadas para o Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, onde serão lavadas e dispostas em bandejas com água do mar. Para o estudo das estruturas vegetativas e reprodutivas será feita a dissociação do material com auxílio de estiletes e/ou cortes anatômicos com lâminas de aço para observação microscópica. As macroalgas serão identificadas com base em Wynne (2011) e Guiry & Guiry (2019) e outros artigos científicos, dissertações e teses (e.g. Nassar *et al.* 1989; Littler & Littler 2000, Barata 2004; Nunes 2005; Brasileiro *et al.* 2015, Guimarães *et al.* 2016). Exemplares testemunho serão depositados no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB).

2.1 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DAS ALGAS CORALINÁCEAS (CALCÁRIAS) INCRUSTANTES

No laboratório, as algas coralináceas incrustantes (ACI) serão fotografadas e separadas em morfótipos, de acordo com sua forma de crescimento (Woelkerling *et al.* 1993), tipos de estruturas reprodutivas (conceptáculos uniporados, multiporados ou soros) e variações morfológicas (e.g., elevado, plano, afundado, dimensões). Em exemplares selecionados serão combinadas três técnicas de identificação: análises de sequências de DNA, cortes histológicos (microscopia óptica) e fragmentos (MEV).

A extração de DNA seguirá o protocolo de Broom (2008). O marcador plastidial (*psbA*), um dos principais marcadores para identificação molecular de ACI, será amplificado com os primers *psbAF1* e *psbAR2* (Yoon *et al.* 2002), conforme Saunders (2005). As sequências serão editadas no programa Geneious 11.15 e comparadas com aquelas de espécimes-tipo disponíveis no *GenBank*, com auxílio da ferramenta BLAST. O sequenciamento será realizado comercialmente por empresa contratada, e as sequências serão depositadas no *GenBank*.

A metodologia para os cortes histológicos será adaptada da técnica de Maneveldt & van der Merwe (2012), como segue:

- 1- Análise da amostra armazenada em sílica gel sob estereomicroscópio, visando selcionar o fragmento com mais estruturas reprodutivas (conceptáculos ou soros).
- 2- Descalcificação em ácido nítrico 10% até o desprendimento das bolhas de CO₂ liberadas durante a reação com o CaCO₃.
- 3- Desidratação em série crescente de etanol (70, 90 e 100%) por pelo menos 40 min. em cada concentração. Durante o intervalo entre as séries de 70 e 90%, limpeza da amostra com pinça e pincel para remoção de resquícios do substrato e materiais que possam danificar o corte (e.g., grãos de areia e outros fragmentos).
- 4- Secagem da amostra em papel toalha por 10 segundos para retirar o excesso de etanol e evitar a diluição da solução de infiltração.
- 5- Imersão da amostra em solução de infiltração (50ml de 2-hidroxietil metacrilato acrescido de 0,5 g de peróxido de benzoila; *kit* Leica Historesin) e manutenção em geladeira por pelo menos 12 h.
- 6- Polimerização: colocação e posicionamento da amostra em fôrma de silicone, considerando a orientação desejada para o corte e adicionando solução de inclusão (1,5 ml de solução de infiltração acrescida de 0,1 ml do agente polimerizante dimetilsulfóxido) até completo recobrimento. Manutenção da fôrma em estufa a 50-60°C por 20-30 min., ou até a polimerização completa.
- 7- Colocação do bloco de historesina em pote plástico vedado contendo sílica gel, por pelo menos 12 h, para remoção da umidade.
- 8- Execução de cortes transversais ou longitudinais de 5-9 µm com navalha de aço (Leica fio C), usando micrótomo rotatório (Jung),
- 9- Coloração por 2-3 min. com azul de toluidina O (C.I. 52040) (0,01 g do corante e 0,03 g de borato de sódio decaidratado diluído em 10 ml de água destilada).
- 10- Retirada do excesso de corante em banho de água destilada (2 min.).
- 11- Adição de gotas de água destilada em uma lâmina histológica e distensão dos cortes na lâmina com pincel e estilete.

12- Montagem de lâminas permanentes adicionando gotas de Entellan (Merck) na lâmina e cobrindo-a com lamínula.

13- Observação das características de interesse em microscópio óptico de campo claro com câmera de captura e auxílio do software ScopelImage DynamicPro.

A metodologia utilizada para as análises em MEV seguirá Bahia (2010), como segue:

1- Lavagem do material fixado em água corrente, para retirada do formol.

2- Secagem em estufa a 50 °C por 24 h.

3- Fratura da alga com alicate ou lâmina de aço visando obter secções transversais e superficiais da região de interesse do talo.

4- Posicionamento dos fragmentos em porta-espécime de alumínio (*stub*) com fita adesiva dupla face de carbono (Electron Microscopy Sciences).

5- Metalização do *stub* com ouro (20 nm) em metalizador Emitech K550X.

6- Observação ao MEV com aceleração de voltagem de 15 kV. 7

Os espécimes serão identificados com base em Woelkerling (1988), Harvey & Woelkerling (2007), Bahia (2014) e Van der Merwe (2015), bem como através de comparações com espécimes tipo disponíveis em herbários. Exemplares testemunho serão depositados no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RB).

2.2 ABUNDÂNCIA DE MACROALGAS E ORGANISMOS BENTÔNICOS NA ÁREA LITORÂNEA

O percentual de cobertura dos principais grupos bentônicos amostrados na área litorânea da APA Costa das Algas e RVS Santa Cruz será estimado com base em imagens adquiridas em fotoquadrados e processadas com uso plataforma CoralNet, descrita acima. Em cada estação serão dispostos, aleatoriamente, 10 fotoquadrados, cada um composto por um mosaico de 15 fotos contíguas totalizando 0,7 m². Para estimativa do percentual de cobertura de cada táxon ou categoria serão empregados 15 pontos distribuídos aleatoriamente sobre cada imagem (225 pontos por quadrado), conforme Francini-Filho et al. (2013). As macroalgas abaixo de cada ponto serão identificadas no menor nível taxonômico possível e os demais organismos serão identificados em grandes grupos (e.g. coral, esponja, zoantídeo, ACl, algas calcárias articuladas, tufo).

A comunidade de macroalgas será categorizada através de estimativas de riqueza (S) e índices de diversidade, cuja similaridade será determinada pelo índice de Kulczynski ou análogos. As porcentagens de cobertura serão avaliadas quanto à variação espaço–temporal através de análises de variância (ANOVA) ou outras ferramentas estatísticas uni e multivariadas.

3. CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE PRESENTE NAS CAUS E MEDIÇÕES COM DATALOGGERS ASSOCIADOS

3.1 PROCEDIMENTO PÓS-RETIRADA DAS CAUS

As CAUs serão removidas dos locais onde foram instaladas após um ano e imediatamente acondicionadas em sacos plásticos, a fim de manter o sedimento depositado e preservar a integridade de organismos frágeis (e.g. ascídias, tufos). No barco, as placas serão desmontadas sobre bandejas plásticas e “rinsadas” com água do mar. Os sedimentos serão armazenados em recipientes plásticos refrigerados. Cada face de cada placa será fotografada e as placas serão preservadas em formalina a 10%, protegidas da luz.

3.2 COMUNIDADE DE ORGANISMOS NAS CAUs

As imagens das placas serão utilizadas para identificar e determinar a abundância de organismos colonizadores (%) com uso do software ImageJ 1.48. A área de cada organismo será obtida através do contorno de seu perímetro na imagem, com uso de mesa digitalizadora. O percentual de cobertura será relativo à área total da superfície da CAU (400 cm²). Organismos calcificadores e não calcificadores serão identificados e comparados com os dados de Reis *et al.* (2016). Especialistas auxiliarão na identificação de grupos específicos (e.g. ascídias e briozoários).

3.3 ANÁLISE DE SEDIMENTO NAS CAUs

Em laboratório, as amostras de sedimento serão decantadas e o excesso de água será removido com bomba peristáltica. Em seguida, os sedimentos serão lavados duas vezes com água deionizada, centrifugados e liofilizados. A mineralogia será determinada através de difração de raios X em um *PANalytical X' Pert Pro Multipurpose Powder Diffractometer* (geometria Bragg-Brentano, radiação CuK α , gerador: 40 mA and 40 kV, amplitude angular 5-90° 2 θ , tomada a cada 0.02°, 180 s por medida). As análises difratométricas serão feitas em triplicata e as amostras serão previamente moídas 2 vezes, por 10 min., e filtradas em malha de 2 μ m. A identificação das fases cristalinas, na forma de picos no difratograma, será feita no software *Panalytical X' Pert Pro V3*, baseada na comparação com dados de minerais de origem orgânica e inorgânica (e.g., *Crystallographic Open Database - COD*). A quantificação de fases cristalinas e parâmetros de rede serão baseadas na técnica de refinamento Rietveld, com uso do software MAUD, também usado para determinar a porcentagem de substituição de Mg por cristais de calcita (Titschack et al. 2011).

3.4 PRODUÇÃO DE CaCO_3 NAS CAUs

As placas serão lavadas separadamente (3x) em solução de hidróxido de cálcio em água deionizada (pH 10), para evitar desmineralização, e posteriormente secas a 60 °C por 5-6 dias até o peso se estabilizar. O material seco será raspado, triturado em moinho de bolas e pesado para obtenção da massa total (calcária e não calcária). Em seguida, alíquotas pulverizadas de 50 mg serão analisadas por difração de raios X, conforme descrito acima. Após a difratometria o material será calcinado a 500°C por 6 dias ou até apresentar peso constante. A massa orgânica será obtida pela subtração da massa total da massa calcinada. O restante do material será submerso em solução a 5% de HNO_3 por 5 h, para dissolução do CaCO_3 , e posteriormente lavado com água deionizada, centrifugado, seco a 60°C durante 5 dias e pesado. A massa carbonática será obtida subtraindo a massa calcinada da massa de cinzas. Para determinar a produção de CaCO_3 , a massa carbonática será normalizada em função da área da CAU e do tempo total de colonização (t), resultando numa taxa de acúmulo líquido de CaCO_3 ($\text{g.cm}^{-2}.\text{t}^{-1}$)

Os contrastes serão feitos com análises de variância (ANOVA) ou outras ferramentas estatísticas uni e multivariadas. Para identificar afinidades entre grupos de organismos colonizadores serão utilizadas estatísticas multivariadas (e.g. escalonamento multidimensional não-métrico - NMDS). A contribuição das variáveis abióticas (e.g. PAR, temperatura) será avaliada com análises de redundância, regressões múltiplas multivariadas, ou modelos lineares (e.g. Distance-based Linear Models), com uso dos softwares *PRIMER*, *PERMANOVA* e *STATISTICA*, ou no ambiente R (R Development Core Team, 2008).

3.5 TEMPERATURA E LUMINOSIDADE

Sensores *HOBO Pendant Light Data Logger* (64K-UA-002-64) implantados junto às CAUs farão o registro da temperatura da água a cada 3 h no período de 12 meses. A intensidade da luz será estimada em LUX, usando os dados dos primeiros 10 dias após a instalação. Valores de radiação fotossinteticamente ativa (PAR) serão obtidos com base em fatores de conversão para μE . A extração dos dados será feita com o software *Hoboware*.

4. CARACTERIZAÇÃO QUALI- E QUANTITATIVA DO SEDIMENTO DAS CAUS E ARMADILHAS DE SEDIMENTO

As amostras das CAUS serão processadas conforme descrito anteriormente. As armadilhas de sedimento serão recolhidas e reinstaladas trimestralmente, transportadas para a superfície com tampas plásticas herméticas de forma a impedir a perda de material fino. Os sedimentos serão transportados para o laboratório em recipientes plásticos refrigerados, no escuro, após decantação e remoção do excesso de água.

4.1 MINERALOGIA E GRANULOMETRIA

Os sedimentos (n=3 réplicas por estação) serão analisados por difração de raios-x, conforme protocolo acima. Será usada alíquota de 50 mg do sedimento de cada estação, a qual será liofilizada, triturada em moinho de bolas e filtrada em malha de 25 µm.

Serão coletados 3 tubos com sedimento de cada estação, totalizando ~100 g. O material será seco por liofilização durante 48 h e passado por peneiras (4, 2 e 1 mm; 500, 250, 100, 50, 25 e 4 µm) empilhadas sobre agitador eletromagnético, durante 1 h. Cada peneira será pesada em balança digital antes e depois da filtragem, para cálculo da porcentagem de sedimentos retidos. Os sedimentos serão classificados com base na escala granulométrica de fragmentos clásticos de Wentworth, como segue: Argila (<0,004 mm); Silte (0,004–0,064 mm); Areia (0,064–2 mm); Grânulo (2–4 mm); Seixo (4–64 mm).

5. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS PARA TOXICOLOGIA

As amostras a serem coletadas para estudos toxicológicos no âmbito do Anexo 1 abrangem uma espécie de macroalga, uma espécie de esponja e duas espécies de corais, coletadas semestralmente. As amostras serão aliqüotadas para análises de metais e biomarcadores, sendo preservadas com identificação individual em freezer e nitrogênio líquido, respectivamente.

6. CARACTERIZAÇÃO DE COMUNIDADES RECIFAIS BENTÔNICAS

6.1 AMOSTRAGEM QUALI-QUANTITATIVA COM FOTOQUADRADOS

A abordagem para detectar a dinâmica das assembléias bênticas recifais é centrada em amostras repetidas realizadas em parcelas fixas, de forma a controlar a heterogeneidade espacial da área de estudo. Esse monitoramento será baseado em imagens obtidas com os fotoquadrados cujas dimensões estão descritas acima e cujo posicionamento será fixado com vergalhões metálicos fincados ao recife. Cada sítio contará com pelo menos 10 parcelas distribuídas aleatoriamente no tempo zero, ao longo de transecções com 30–50 m, tanto no topo (iluminado e aproximadamente horizontal) quanto na parede (sombreado e inclinado) das estruturas recifais. O processamento das imagens será feito na plataforma Coral Net conforme descrito acima, porém com uso de 30 pontos de anotação por imagem. Complementarmente, será feito imageamento hiperspectral em parcelas selecionadas (n= 5), visando acelerar e ampliar a resolução taxonômica do processamento semi-automatizado, conforme Chennu et al. (2017). Os dados de cobertura bêntica serão processados com os softwares *PRIMER*, *PERMANOVA* e no ambiente R, buscando estabelecer contrastes espaciais e temporais, bem como associações com os parâmetros físico-químicos.

6.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA COLUNA D'ÁGUA

Em cada estação amostral será realizada perfilagem com CTD e ADCP, aos quais será acoplado instrumental multiparamétrico para aquisição de dados de turbidez, fluorescência e pH (Plataforma Seaguard, Aanderaa). Em estações representativas da área de estudo também serão feitas medidas contínuas (fundeios) abrangendo pelo menos um ciclo de marés (e.g. Atamanchuk et al. 2015, Wesslander et al. 2011). Os dados físico-químicos serão descarregados e checados a bordo, com pré-processamento no software *AADI Real Time Collector* e *Data Studio*.

Complementarmente serão extraídos, através de sensoriamento remoto, dados de atenuação da luz (turbidez), temperatura superficial do mar (SST), clorofila a (Chla) e radiação fotossinteticamente ativa (iPAR), na escala regional e para os períodos amostrais cobertos pelo projeto. A extração, processamento e exploração dessas variáveis será feita em ambiente R, integrado ao Sistema de Informação Geográfica (SIG) do projeto (ArcGIS/ESRI). Os produtos processados são derivados do sensor MODIS (*MODerate Resolution Imaging Spectroradiometer*), acoplado ao satélite Aqua e disponíveis em série histórica de 15 anos (2003-2018) com resolução temporal de dois dias e resolução espacial de 4 km. As variáveis serão obtidas em repositórios da *National Oceanic and Atmospheric Administration* (NOAA) dos EUA. Os valores de K490 (*Diffuse Attenuation Coefficient, 490nm*), Chla e iPAR serão obtidas no ERDDAP (*Easier Access to Scientific Data*), com dados calibrados pelo *Ocean Biology Processing Group* (<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov/>), ao passo que os valores de SST (4µ, nighttime) serão adquiridos na PO.DAAC (*Physical Oceanography Distributed Active Archive Center*).

6.3 AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO FISIOLÓGICA DE CORAIS

A condição fisiológica de corais será avaliada por fluorimetria de pulso modulado (Ralph & Gademann, 2005). Essa abordagem permite acessar a atividade fotossintética dos endossimbiontes por meio de curvas rápidas de luz (i.e. *Rapid Light Curves* - RLC's), bem como descrever o estado atual de seu aparato fotossintético e fazer inferências sobre o regime de luz ao qual o coral foi recentemente submetido. Os dados extraídos do fluorímetro (Diving-PAM I, blue light) serão pré-processados com o software WinControl (WALZ, Germany) e analisados de acordo com Ralph & Gademann (2005), visando obter: capacidade fotossintética máxima (rETR_m), irradiância mínima saturante (E_k) e Rendimentos Quânticos Complementares (ΦPSII, ΦNPQ, ΦNO). Esses parâmetros serão analisados no ambiente R, com o objetivo de estabelecer contrastes espaciais e temporais, bem como associações com parâmetros físico-químicos do ambiente. Nesse sentido, também serão feitas comparações entre curvas, análises fatoriais e análises multivariadas (e.g. PCA).

6.4 CARACTERIZAÇÃO DE SIMBIONTES DE CORAIS

6.4.1 Análise qualitativa e quantitativa de zooxantelas

Visando normalizar a densidade de simbiontes e pigmentos, as imagens dos espécimes de corais dos quais foram raspados tecidos serão processadas no módulo de análise de área e comprimento do software *Coral Point Count with Excel Extensions* - CPCe (Kohler & Gill, 2006). A escala das fotos será calibrada convertendo-se o valor de pixels em cm, usando como base a régua da imagem.

6.4.2 Caracterização citométrica de zooxantelas

As suspensões de tecido, fixadas em paraformaldeído 1% logo após a coleta, serão homogeneizadas em vortex e submetidas a um sonificador com sonda de 3mm de diâmetro (Cole Palmer CPX 130) por 30 segundos, em pulsos intervalados de 1 segundo a 20% de amplitude, visando romper grumos de células. A suspensão será filtrada em malha de nylon de 45 μm para remoção de partículas maiores (e.g., sedimento, fragmentos de esqueleto). Esferas de poliestireno fluorescentes (diâmetro nominal de 3 μm) serão adicionadas às amostras como controles internos. Alíquotas da suspensão serão analisadas por citometria de fluxo multiparamétrica (Cytotflex, Beckman-Coulter) utilizando laser azul (488nm) para excitação, sob fluxo de 50-100 $\mu\text{L min}^{-1}$ durante por 2 a 5 min. Células de endossimbiontes serão discriminadas em citogramas de luz espalhada frontalmente (FSC-H, proxy para tamanho celular) por fluorescência da clorofila (FL3-H). Dados de contagens celulares, espalhamento de luz e fluorescência da clorofila serão exportados com o software do fabricante. Os valores de FSC-H e FL3-H serão normalizados por valores das beads de cada amostra (FL3-H, 670 nm) e as densidades de células serão expressas por unidade de área de coral.

6.4.3 Caracterização morfológica de zooxantelas

Para análises morfométricas e estimativas de biovolume de zooxantelas, uma alíquota da suspensão de cada coral será analisada em sistema de imageamento em fluxo (*FlowCam® model VS, Fluid Imaging Technologies*) com célula de fluxo FOV de 90 μm e fluxo de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. As células serão imageadas em objetiva de 20X de aumento e taxa de aquisição de 20 imagens.segundo⁻¹. Células em foco serão selecionadas semi-automaticamente para medições com o software *VisualSpreadsheet* (Fluid Imaging Technologies) (Figura 1A). Comprimento e largura serão usados para estimativas de biovolume ($\mu\text{m}^3 \text{ célula}^{-1}$) através da aproximação do formato de um esferoide prolado (Sun & Liu, 2003; Figura 1B).

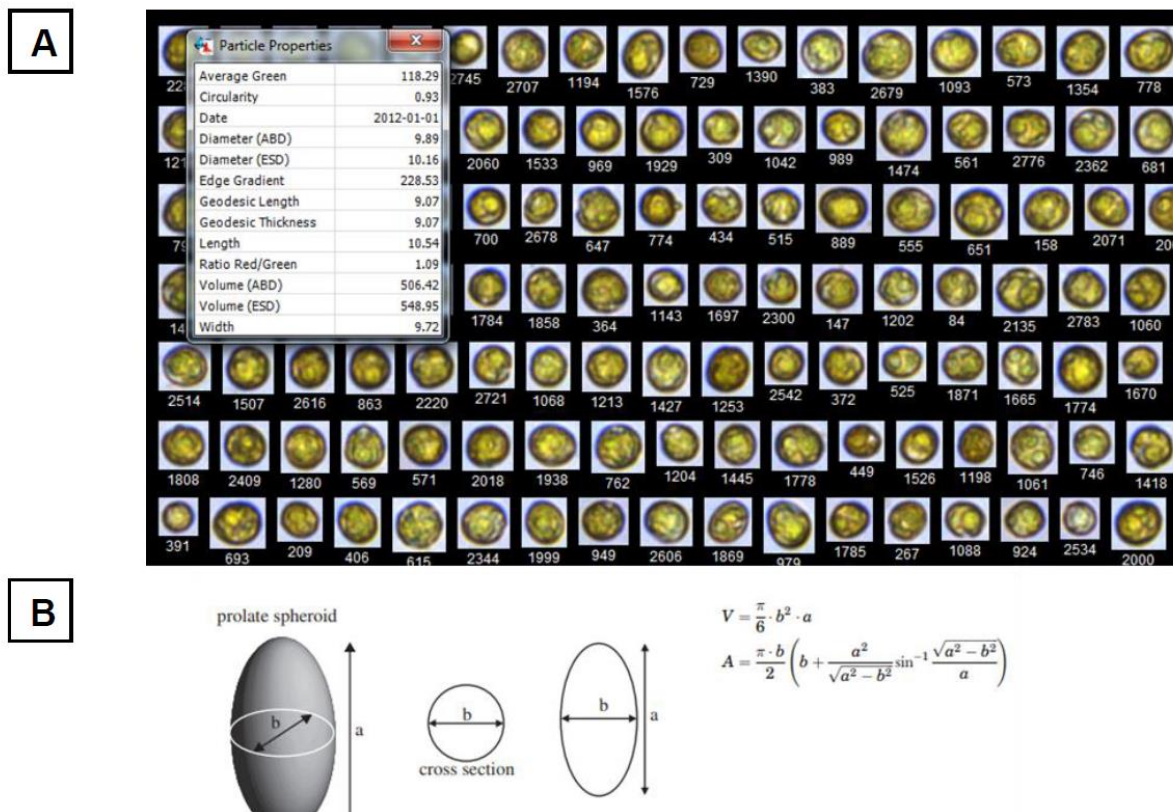


Figura 1. (A) Imagens obtidas com o software *VisualSpeedShear*. A janela “particle properties” indica os valores dos parâmetros medidos para cada célula. (B) O esquema geométrico representa a aproximação do formato celular com a equação para o cálculo de biovolume (conforme Sun & Liu, 2003). Na equação, “b” representa a largura das células e “a” o comprimento.

6.4.4 Caracterização genética de zooxantelas

6.4.4.1 Extração de DNA

As amostras preservadas em nitrogênio líquido serão descongeladas no gelo e no escuro, e uma alíquota de 300 µL será armazenada por uma semana em microtubo com 500 µL de CHAOS Buffer (4M tiocianato de guanidina, 0.1% solução de N-lauroyl sarcosina, 10 mM Tris pH8, 0.1M 2-mercaptoetanol), segundo protocolo de Fukami et al. (2004). Posteriormente, será adicionado volume equivalente de buffer de extração de fenóis (PEB - 100 mM TrisCl pH8, 10 mM EDTA, 0.1% SDS), e o DNA Total será extraído com o método Fenol/Clorofórmio, seguido de precipitação por etanol e ressuspensão em TE (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA) com RNase (10 mg/ml).

6.4.4.2 Amplificação e sequenciamento

A comunidade de zooxantelas será caracterizada com base na região nuclear do espaçador interno dois transcrito do DNA Ribossomal (ITS2), a qual é amplamente utilizada para caracterização dos grupos de Symbiodiniaceae (LaJeunesse & Pinzón 2007, Stat et al. 2011). A região ITS2 será amplificada com os iniciadores descritos em Pochon et al. (2001) e com iniciador sintetizado com as

sequências adaptadoras necessárias para o protocolo de sequenciamento escolhido (Quigley et al. 2016).

Os tubos com reagentes e DNA serão submetidos a ciclos de temperatura no termociclador MiniAmp (Applied Biosystems). Inicialmente será realizado um ciclo a 95°C por 2 min. para abertura da dupla fita de DNA, seguido de 35 ciclos que se iniciam pela temperatura de desnaturação (95°C) por 45 segundos, seguido por 45 segundos na temperatura ótima de adesão dos iniciadores (56°C) e de 45 segundos a 72°C para extensão das fitas pela enzima Taq polimerase. Por fim, será mantida a temperatura de 72°C por 5 min. para a polimerização de fitas inacabadas. Os produtos resultantes dessa reação serão verificados em uma corrida de eletroforese com gel de agarose (1,5%). As amostras serão misturadas ao corante de DNA *Gel/Red* (Biotium) para visualização em transiluminador ultravioleta. A quantidade e tamanho dos fragmentos serão estimados por comparação com escada padrão (*100 pb Plus DNA ladder*), para confirmação da amplificação.

Sequências de amostras ambientais serão obtidas por sequenciamento de nova geração na plataforma *MySeq Illumina*, seguindo o protocolo de Arif et al. (2014) adaptado por Alanagreh et al. (2017). Serão gerados cerca de 30K em reads para cada amostra, buscando representar a diversidade dos organismos mais frequentes. A reação de ligação de adaptadores de biblioteca, para que as sequências possam ser separadas posteriormente, serão realizados em laboratório comercial especializado, assim como a reação de sequenciamento e geração dos dados de leituras. Os dados brutos serão tratados no software *MOTHUR* (Schloss et al 2009) e as sequências com baixos valores de qualidade (QC<30) e tamanhos <200 bp serão retiradas.

As sequências de ITS2 para cada biblioteca serão ranqueadas de acordo com a frequência em que aparecem na amostra. As dez sequências mais frequentes serão comparadas com dados do *GenBank* através da ferramenta *BLAST*. A identificação será baseada nos valores de Identidade mínimos de 50 e *E-value* de 1×10^{-5} . Serão realizadas análises filogenéticas para verificação e validação taxonômica. Para isso, as sequências serão alinhadas com o algoritmo *Clustal* e o melhor modelo evolutivo será inferido com a ferramenta *JmodelTest*. As análises filogenéticas serão realizadas por método Bayesiano no software *MRBAYES 3.2.3* (Ronquist & Huelsenbeck, 2003).

Índices de diversidade serão computados para cada colônia, para os conjuntos de colônias de uma mesma espécie, entre a mesma espécie em pontos de coleta distintos, e submetidas a contrastes.

7. CARACTERIZAÇÃO DAS COMUNIDADES PLANCTÔNICAS ASSOCIADAS AOS FUNDOS RECIFAIS

7.1 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO PLÂNCTON

7.1.1 Quantificação por citometria de fluxo multiparamétrica

As frações do pico-, nano- e parte do microplâncton mais abundantes serão quantificadas por citometria de fluxo multiparamétrica em citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter) equipado com lasers violeta (405nm), azul (488nm) e vermelho (628nm). Antes das análises, as amostras armazenadas em N-líquido serão descongeladas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A fração autotrófica (cianobactérias e eucariotos unicelulares clorofilados) será analisada de acordo com Dubelar & Jonker (2000) e Marie *et al.* (2014). O limiar de detecção (*threshold*) será aplicado ao sinal de fluorescência vermelha emitida pela clorofila (canal FL3-H). Amostras serão aspiradas a uma velocidade entre 50 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 1 a 5 min. Serão coletados sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H), de fluorescência da clorofila, e dos pigmentos acessórios ficoeritrina e ficocianina, nos sensores correspondentes aos picos de emissão destes pigmentos. A fração heterotrófica (bactérias e eucariotos unicelulares) será analisada de acordo com Mari *et al.* (1997).

Alíquotas de 180 μL de cada amostra serão coradas com fluorocromo para ácidos nucleicos SYBR Green I (Thermo Scientific, S-7567). Esferas fluorescentes de poliestireno de 1 μm serão adicionadas como controle interno. As amostras serão incubadas a temperatura ambiente por 15 min. antes da citometria de fluxo, a uma velocidade entre 20 e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$, por 1 a 2 min.. O *threshold* será aplicado ao sinal de fluorescência verde emitida pelo fluorocromo (canal FL1-H). Serão coletados os sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H) e os sinais de fluorescência do SYBR Green I e pigmentos fotossintéticos.

Para o processamento dos dados citométricos, os arquivos gerados pelo citômetro, no formato FCS, serão analisados no programa FlowJo (FlowJo, LLC) , visando a delimitação de populações alvo e cálculos de concentração de células.

7.1.2 Diversidade citométrica

Os dados citométricos serão processados no software FlowJo para remoção de partículas detríticas, ruído eletrônico e a população de esferas de controle interno. As estimativas de diversidade utilizarão os arquivos FCS previamente tratados, seguindo a rotina de agrupamento de Props *et al.* (2016) no ambiente R. Os parâmetros de interesse para as análises de diversidade citométrica serão: espalhamento de luz frontal e lateral (FSC-H e SSC-H) e os sinais de fluorescência dos pigmentos naturais das células (clorofila, ficoeritrina e ficocianina). O índice adotado será a série de Hill (1973), considerado ecologicamente mais significativo. Também serão calculados índices de riqueza (eq. 1), diversidade exponencial de Shannon (eq. 2) e diversidade de Simpson (eq. 3).

$$D_{q=0} = S \quad \text{eq. 1}$$

$$D_{q=1} = e^{-\sum_{i=1}^S p_i \ln(p_i)} \quad \text{eq. 2}$$

$$D_{q=2} = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2} \quad \text{eq. 3}$$

7.1.3 Análises quali- quantitativas por microscopia

Após a chegada ao laboratório, amostras do plâncton (2L) fixadas em formaldeído 2% serão sedimentadas por 7 dias, com posterior remoção de 90% do volume do sobrenadante. O volume restante, contendo as células sedimentadas, será transferido para frasco âmbar de 250 mL e estocado em geladeira. As amostras concentradas serão analisadas em sistema automatizado de imageamento em fluxo e através de microscopia invertida, conforme descrito a seguir.

7.2 ANÁLISE DE COMUNIDADES PLANCTÔNICAS POR IMAGEAMENTO EM FLUXO

Células do plâncton na faixa entre 5 e 100µm serão analisadas em um sistema automatizado de imageamento em fluxo (FlowCam, Fluid Imaging Technologies) conforme Sieracki *et al.* (1998) . Alíquotas de 10 mL das amostras concentradas serão filtradas em malha de nylon de 100µm para remoção de partículas grandes que possam obstruir as linhas do equipamento. As análises serão realizadas em modo autoimage com fluxo de 100µL min⁻¹ por 20 a 30 min, com célula de fluxo FOV de 90µm e objetiva 10X. O processamento de classificação e análise morfométrica será feito com o software *VisualSpreadSheet*.

7.3 ANÁLISE DE COMUNIDADES PLANCTÔNICAS EM MICROSCOPIA INVERTIDA

Organismos do fito- e protozooplâncton na faixa de >10µm serão quantificados conforme Uthermöhl (1958) e Lund *et al.* (1958), usando volumes de 10-100mL de amostra sedimentadas por 24-72h. Os organismos serão quantificados em microscópio invertido de campo claro sob aumento de 10-20 e identificados no menor nível taxonômico possível com base em Tomas (1997), Sournia (1986), Richard (1987) e Chrétiennot-Dinet (1990).

7.4 QUANTIFICAÇÃO DE PIGMENTOS

A análise quali e quantitativa de pigmentos clorofilianos no tecido de corais e na água será feita através de extração em acetona e detecção por espectrofluorimetria, usando os protocolos de extração e análises descritos a seguir.

A extração dos pigmentos clorofilianos contidos nas suspensões de células de tecidos de coral será realizada em acetona 90%. As amostras serão filtradas em filtros GF/F de 47 mm de diâmetro para concentrar a suspensão e retirar o excesso de água. Em seguida, os filtros serão transferidos para tubos de vidro com 6 mL de acetona 90% e macerados com bastão de vidro. Após esta etapa, os tubos serão selados com *Parafilm* e submetidos a banho sonicator por 2 min. a 4°C. As amostras serão armazenadas a -20°C por 12h, centrifugadas a 2500 rpm por 10 min., e as fluorescências dos extratos serão medidas em um espectrofluorímetro *VARIAN* (CARY ECLIPSE). As concentrações de clorofilas e feofitinas serão calculadas segundo o método de Neveux & Lantoine (1993) modificado por Vanzan et al. (2015). Para isso, será feita a aquisição de 31 espectros de emissão de fluorescência entre comprimentos de onda de 615 e 715nm, com resolução de 2nm e excitação entre 390-480 nm com resolução de 3nm.

Para extração dos pigmentos clorofilianos na água, os filtros GF/F com material coletado em campo serão transferidos dos tubos criogênicos de armazenagem para tubos de vidro com 6mL de acetona a 90%. Em seguida, os filtros serão macerados com bastão de vidro e os tubos com extratos acetônicos serão selados com *Parafilm* e mantidos a 4°C ao abrigo da luz por 12 h, sendo subsequentemente centrifugados por 10 min. a 2500 rpm. As fluorescências dos extratos serão medidas no espectrofluorímetro e as concentrações pigmentares serão obtidas com os mesmos procedimentos usados para análise de pigmentos em tecidos de corais, conforme descrito acima.

8. ABORDAGENS ANALÍTICAS

Os conjuntos de dados brutos, inseridos inicialmente em planilhas Excel, foram codificados e formatados com uso do software livre R (R CORE DEVELOPMENT TEAM, 2018) e em softwares comerciais (e.g. CLARKE; WARWICK, 2001), sempre passando por procedimentos básicos de controle de qualidade. Os pacotes utilizados no software R, para tratamento e controle de qualidade, bem como para as análises exploratórias, incluíram Dplyr, Psych e tidyverse, ggplot2 e GGally para compor as visualizações, e pca, FactoMineR, factoextra para as análises multivariadas, com emprego da biblioteca ggbiplot para visualização. A maior parte dos dados possui uma estrutura com alta dimensionalidade, dado o grande número de variáveis exploradas simultaneamente. As análises desses dados envolveram técnicas multivariadas de ordenação, visando descobrir padrões em dimensões reduzidas, incluindo Análise de Componentes Principais (PCA), Escalonamento Multidimensional (MDS), modelos lineares, e análises de redundância baseadas em distâncias (e.g. DISTLM e dbRDA).

Nas análises de PCA, novas componentes de dimensão reduzida são criadas com base em projeções ortogonais, com o objetivo de minimizar a variação residual e maximizar a variabilidade explicada no espaço euclidiano (CLARKE; WARWICK, 2001). Os mapas fatoriais mostram a relação entre as variáveis originais e os dois componentes principais (Dim 1 e 2, ou PC 1 e 2), indicando a contribuição de cada uma delas na ordenação. O MDS, também denominado Análise de Redução de Dimensão Sem Restrição, foca na preservação da ordem das dissimilaridades para uma escolha de dimensões,

previamente definidas. O algoritmo do MDS busca construir um "mapa de configuração" para posicionar as espécies e amostras minimizando o estresse, uma medida que reflete quão bem a distância euclidiana representa a dissimilaridade original. O estresse varia entre zero e um, com zero indicando uma configuração perfeita (CLARKE; WARWICK, 1994).

Os modelos lineares buscam representar a relação "linear" entre duas variáveis, mensurando o impacto das variáveis preditoras (e.g. variáveis ambientais) sobre a variável resposta (e.g. cobertura de corais, abundância de rodólitos), baseado em suposições probabilísticas (MCCULLAGH; NELDER, 1989). Os Modelos Lineares Baseados em Distâncias (DISTLM), amplamente utilizados no trabalho, modelam a regressão linear multivariada e se baseiam em uma matriz de similaridades (dissimilaridades) e utilização de um procedimento de permutação que atenua premissas de normalidade (LEGENDRE; ANDERSON, 1999). A Análise de Redundância Baseada em Distâncias (dbRDA) é uma técnica de redução de dimensões com restrições, baseada nos resultados do DISTLM, fornecendo um panorama completo das variáveis a reduzir e das covariáveis (variáveis ambientais) (LEGENDRE; ANDERSON, 1999). Em caráter complementar, foram apresentadas análises de agrupamento ("cluster"), com medidas de similaridade e algoritmos de agrupamento hierárquico (aglomerativos ou divisivos) contextualizados mais detalhadamente em cada contexto de aplicação (CLARKE; WARWICK, 2001), bem como análises de similaridade de porcentagens (SIMPER), com objetivo de identificar taxa com maior contribuição na diferenciação entre grupos de amostras. Os passos das rotinas de MDS, DISTLM, dbRDA e SIMPER estão detalhadamente descritos por CLARKE; GORLEY (2015).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIF C., DANIELS C., BAYER T., BANGUERA-HINESTROZA E., BARBROOK A., HOWE C.J., ... VOOLSTRA C. R. Assessing Symbiodinium diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. **Mol. Ecol.** 23(17): 4418-4433. 2014.

ATAMANCHUK D., M. KONONETS, P.J. THOMAS, J. HOVDENES, A. TENGBERG and P.O.J. HALL Continuous long-term observations of the carbonate system dynamics in the water column of a temperate fjord. **Journal of Marine Systems**, 148, 272–284. 2015.

BAHIA, R.G.; ABRANTES, D.P.; BRASILEIRO P.S.; PEREIRA-FILHO G.H.; AMADO-FILHO, G.M. Rhodolith bed structure along a depth gradient on the northern coast of Bahia State, Brazil. **Brazilian Journal of Oceanography** 58: 323-337. 2010.

BAHIA, R. G. **Algas coralináceas formadoras de rodólitos da plataforma continental tropical e ilhas oceânicas do Brasil: levantamento florístico e taxonomia**. Tese de Doutorado, Escola Nacional de Botânica Tropical, Rio de Janeiro, 221 pp. 2014.

BARATA, D. **Clorofíceas marinhas bentônicas do Estado do Espírito Santo**. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. 210p. 2004.

BEIJBOM, O.; EDMUNDS, P.J.; ROELFSEMA, C.; SMITH, J.; KLINE, D.I.; NEAL, B.P. *et al.* Towards automated annotation of benthic survey images: Variability of human experts and operational modes of automation. **PLoS ONE** 10(7): e0130312. 2015.

BOSENSE, D. W. J. & PEDLEY, H. M. Sedimentology and palaeoecology of Miocene coralline algal biostrome from the Maltese Islands. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 38: 9–43. 1982.

BRASILEIRO, P.S.; PEREIRA-FILHO, G.H.; BAHIA, R.G.; ABRANTES, D.P.; GUIMARÃES, S.M.P.B.; MOURA, R.L.; FRANCINI-FILHO, R.B.; BASTOS, A.C.; AMADO-FILHO, G. M. Macroalgal composition and community structure of the largest rhodolith beds in the world. **Marine Biodiversity**, 46:407. 2016.

BROOM, J.E.S.; HART, D. R.; FARR, T. J.; NELSON, W. A.; NEILL, K. F.; HARVEY, A. S.; WOELKERLING, W. J. Utility of *psbA* and *rSSU* for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. **Mol. Phyl. Evol.** 46: 958–973. 2008.

BRUCE, T.; MEIRELLES, P. M.; GARCIA, G.; PARANHOS, R.; REZENDE, C. E.; MOURA, R. L.; FILHO, R. F.; CONI, E. O. C.; VASCONCELOS, A. T.; AMADO-FILHO, G.; HATAY, M.; SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R.; DINSDALE, E.; THOMPSON, F. L. Abrolhos Bank reef health evaluated by means of water quality, microbial diversity, benthic cover, and fish biomass data. **PLoS ONE** 7:e36687. 2012.

CHENNU A.; FARBER P.; DE'ATH, G., de BEER, D.; FABRICIUS, K.E. A diver-operated hyperspectral imaging and topographic surveying system for automated mapping of benthic habitats. **Scientific Reports** 7: 7122. 2017.

DUBELAAR G.B.J., JONKER R.R. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. **Sci. Mar.** 64 (2): 135-156. 2000.

HARVEY, A.S. & WOELKERLING, W.J. A guide to nongeniculate coralline red algal (Corallinales, Rhodophyta) rhodolith identification. **Ciencias Marinas** 33: 411-426. 2007.

FLÜGEL, E. **Microfacies of carbonate rocks**. Elsevier: 983p. 2009.

FRANCINI-FILHO, R. B.; CONI, E. C. O.; MEIRELLES, P. M.; AMADO-FILHO, G. M.; THOMPSON, F. L.; PEREIRA-FILHO, G. H.; BASTOS, A. C.; (...); MOURA, R. L. Dynamics of coral reef benthic assemblages of the Abrolhos Bank, Eastern Brazil: inferences on natural and anthropogenic drivers. **PLoS ONE** 8:e54260. 2013.

GUIMARÃES, S. M. P. B., CRISPINO, L. M. B., NUNES, J. M. C. **Flora Ficológica do Estado de São Paulo - Phaeophyceae**. RiMa Editora. 2016.

KOHLER, K.E., GILL, S.M. Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): a Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. **Computers and Geosciences** 32 (9), 1259–1269. 2006.

LITTLER, D.S. & LITTLER, M.M. Caribbean reef plants. An identification guide to the reef plants of the Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico. pp. 1-542. **Washington: Offshore Graphics**. 2000.

LUND J.W.G., KIPLING C., LE CREN E.D. **Hydrobiologia** 11(2): 143-170. 1958.

GRAHAM, D. J. & MIDGLEY, N. G. Graphical representation of particle shape using triangular Diagrams: an Excel spreadsheet method. **Earth Surface Processes and Landforms**, 25: 1473–1477. 2000.

GUIRY, M.D. & GUIRY, G.M **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org> 2019.

MANEVELDT, G.W. & VAN DER MERWE *Heydrichia cerasina* sp. nov. (Sporolithales, Corallinophycidae, Rhodophyta) from the southernmost tip of Africa. **Phycologia** 51: 11–21. 2012.

MARIE D., PARTENSKY F., JACQUET S., VAULOT, D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 186–193. 1997.

MARIE D., RIGAUT-JALABERT F., VAULOT, D. An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. *Cytometry* 85, 962–968. 2014.

MEIRELLES, P.M.; AMADO-FILHO, G.M.; PEREIRA-FILHO, G.H.; PINHEIRO, H.T.; MOURA, R.L.; JOYEUX J-C *et al.* Baseline assessment of mesophotic reefs of the Vitória- Trindade seamount chain based on water quality, microbial diversity, benthic cover and fish biomass data. **PLoS ONE** 10(6): e0130084. 2015.

NASSAR, C.G.A.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; MAURAT, M.C.S., FALCÃO, C.; MITCHELL, G.J.P. Feofíceas do litoral norte do estado do Espírito Santo. **Ínsula** 19: 143-168. 1989.

NEVEUX J., LANTOINE F. Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. **Deep-Sea Res.** I 40(9): 1747-1765. 1993.

PERRY, C. T. Morphology and occurrence of rhodoliths in siliciclastic, intertidal environments from a high latitude reef setting, southern Mozambique. **Marine Geology** 214: 143–161. 2005.

POCHON X., PAWLOWSKI J., ZANINETTI L., ROWAN R. High genetic diversity and relative specificity among Symbiodinium-like endosymbiotic dinoflagellates in soritid foraminiferans. **Mar. Biol.** 139(6): 1069-1078. 2001.

PROPS R., MONSIEURS P., MYSARA M., CLEMENT L., BOON N. Measuring the biodiversity of microbial communities by flow cytometry. **Meth. Ecol. Evol.** 7(11): 1376-1385. 2016.

QUIGLEY K.M., WILLIS B.L., BAY L.K. Maternal effects and Symbiodinium community composition drive differential patterns in juvenile survival in the coral *Acropora tenuis*. **Royal Society Open Science** 3(10): 160471. 2016.

RALPH PJ, GADEMANN R Rapid light curves: a powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquat Bot** 82:222–237 2005.

REIS, V.M.D.; KAREZ, C.S.; MARIATH, R.; DE MORAES, F.C.; DE CARVALHO, R.T.; BRASILEIRO, P.S. *et al.* Carbonate production by benthic communities on shallow coralgal reefs of Abrolhos Bank, Brazil. **PLoS ONE** 11(4): e0154417. 2016.

SAUNDERS, G. W. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1879–88. 2005.

SIERACKI C.K., SIERACKI M.E., YENTSCH C.S. An Imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 168: 285-296. 1998.

STAT M., BIRD C.E., POCHON X., CHASQUI L., CHAUKA L.J., CONCEPCION G.T., GATES R.D. . Variation in *Symbiodinium* ITS2 sequence assemblages among coral colonies. **PLoS One** 6(1): e15854. 2011.

THORNHILL D.J., LAJEUNESSE T.C., SANTOS S.R. Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. **Mol. Ecol.** 16(24): 5326-5340. 2007.

TITSCHACK, J.; GOETZ-NEUNHOEFFER, F.; NEUBAUER, J. Magnesium quantification in calcites [(Ca,Mg)CO₃] by Rietveld-based XRD analysis: Revisiting a well-established method. **American Mineralogist**. 2011; 96 (7):1028–1038. 2011.

TOMAS C.R. **Identifying Marine Phytoplankton**. San Diego, CA: Academic Press, 858p. 1997.

UTERMÖHL, H. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton methodik. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* 9, 1-38. 1958.

VAN DER MERWE, E. **Systematics of the non-geniculate coralline red algae from the South African south coast**. PhD thesis, University of the Western Cape, Bellville, 344 pp. 2015.

VANZAN M., BARRERA-ALBA J.J., TENÓRIO M.M.B., TENENBAUM D.R. Picoplankton and nanoplankton variability in an Antarctic shallow coastal zone (Admiralty Bay) during the austral summer of 2010/2011. **Polar Biol.** 38:1-18. 2015.

WESSLANDER K., P. HALL, S. HJALMARSSON, D. LEFEVRE, A. OMSTEDT, A. RUTGERSSON, E. SAHLÉE AND A. TENGBERG. Observed carbon dioxide and oxygen dynamics in a Baltic Sea coastal region. **Journal of Marine Systems**, 86: 1–9. 2011.

WOELKERLING, W.J.. **The coralline red algae : an analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. Brithish Museum (Natural History)**, London and Oxford University Press, Oxford, 268 pp. 1988.

WOELKERLING, W.J. IRVINE, L.M.; HARVEY, A. Growth-forms in non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). **Australian Systematic Botany** 6: 277-293. 1993.

WYNNE, M.J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: third revision. NOVA HEDWIGIA BEIHEFTE 140: [1] 7-166. 2011.

YOON, H. S.; HACKETT, J. D.; BHATTACHARYA, D. A single origin of the peridinin- and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99(18): 11724–9. 2002.