

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
COORDENADORIA ESPECIAL DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA

Thaise Ricardo de Freitas

**MÉTODO AUTOMATIZADO PARA ESTIMATIVA DA
BIOMASSA DE FORAMINÍFEROS BENTÔNICOS**

Florianópolis
2019

Thaise Ricardo de Freitas

**MÉTODO AUTOMATIZADO PARA ESTIMATIVA DA
BIOMASSA DE FORAMINÍFEROS BENTÔNICOS**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Oceanografia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Oceanografia Orientadora: Profa. Dra.
Carla Bonetti
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Tadeu
Bacalhau

Florianópolis
2019

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

Freitas, Thaise Ricardo de
MÉTODO AUTOMATIZADO PARA ESTIMATIVA DA BIOMASSA
DE FORAMINÍFEROS BENTÔNICOS / Thaise Ricardo de
Freitas ; orientadora, Carla Bonetti, coorientador,
Eduardo Bacalhau, 2019.
59 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e
Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em
Oceanografia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

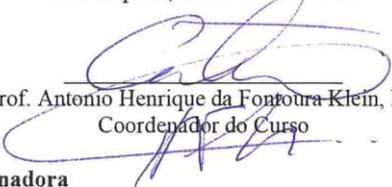
1. Oceanografia. 2. análise de imagens. 3.
biomassa. 4. biometria. 5. microfósseis. I. Bonetti,
Carla. II. Bacalhau, Eduardo. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Oceanografia. IV. Título.

Thaise Ricardo de Freitas

MÉTODO AUTOMATIZADO PARA ESTIMATIVA DA BIOMASSA DE FORAMINÍFEROS BENTÔNICOS

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Oceanografia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Oceanografia

Florianópolis, 10 de abril de 2019.

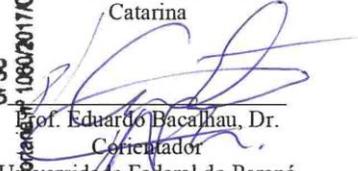

Prof. Antonio Henrique da Fontoura Klein, Dr.
Coordenador do Curso

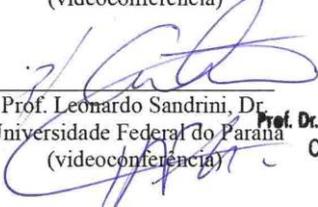
Banca Examinadora

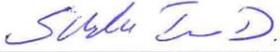
Prof. Dr. Antônio Henrique da Fontoura Klein
Coordenador do PPGOCEANO
UFSC
Portaria nº 1060/2017/GR

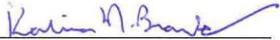

Prof.ª Carla Bonetti, Dr.ª

Orientadora
Universidade Federal de Santa
Catarina


Prof. Eduardo Bacalhau, Dr.
Orientador
Universidade Federal do Paraná
(videoconferência)


Prof. Leonardo Sandrini, Dr.
Universidade Federal do Paraná
(videoconferência)


Sibelle Trevisan Disaró, Dr.
Universidade Federal do Paraná


Kalina Brauko, Dr.
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof. Dr. Antônio Henrique da Fontoura Klein
Coordenador do PPGOCEANO
UFSC
Portaria nº 1060/2017/GR

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia ser feito sem a compreensão, carinho e força que toda minha família me fornece. Todos aqueles que mesmo longe, em tantas cidades diferentes, se importam e amam. Mãe, obrigada por ser a pessoa mais forte que eu conheço. Obrigada por me entender e me ajudar a entender a vida. Marco, te agradeço por ser meu companheiro em todos os sentidos. Por me acompanhar e fortalecer nos momentos bons e ruins dessa jornada.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Oceanografia Costeira (LOC/UFSC) e do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia (PPGOCEANO/UFSC) pelos momentos compartilhados pela convivência harmoniosa e troca de experiências que mantivemos durante o desenvolvimento de nossos trabalhos e também pelos cafezinhos e bate-papos revigorantes no meio do expediente. Em especial as Deusas Ana, Bruna, Char, Faynna, Inaie, Jessicas, Mai, Mari, Paula e Oxana, que sem vocês e nossas jantas esse período não seria o mesmo.

Obrigada aos amigos queridos Davi, Micael, Paulo e Tiago que me suportaram enquanto eu surtava com o Python e o R. Vocês me ensinaram muito. Devo um agradecimento especial ao Professor Maurício Camargo, que abriu minha mente as possibilidades do R desde cedo, seu trabalho gerou alguns frutos. Aos meus orientadores Prof. Carla Bonetti e Prof. Eduardo Bacalhau, e a Dra. Sibelle Disaró agradeço profundamente por todo o incentivo, por acreditar nesse trabalho, pela contribuição intelectual e suporte nesses últimos anos.

Agradeço aos membros da banca Dr. André Rodrigues, Dra Débora Diniz, Dra. Kalina Brauko, Prof. Leonardo Sandrini e Dra. Sibelle Disaró por dispor de seu tempo para contribuir com esse trabalho.

Um agradecimento especial ao Prof. Paulo Lana que me incentivou a iniciar esse mestrado e seguir o caminho científico. Por fim, agradeço a Coordenadoria de Apoio à Pesquisa e Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq), que forneceram bolsas de estudo durante o desenvolvimento desse trabalho.

“Coffee is a way of stealing time that should by rights belong to your older self.”
Terry Pratchett, Thud

RESUMO

Foraminíferos possuem um papel importante na transferência de energia e consumo de carbono no fundo marinho. A contribuição efetiva destes organismos como componentes heterotróficos nas comunidades bentônicas é frequentemente negligenciada pela falta de métodos quantitativos viáveis que descrevam a sua biomassa com estimativas precisas e realistas. Os métodos não destrutivos disponíveis mais utilizados, como o biovolume, são limitados pelo tempo de processamento demorado e o esforço de amostragem. Desse modo, o objetivo desse estudo foi desenvolver uma estratégia de automatização da aquisição de dados de biovolume e biomassa de foraminíferos através do processamento de imagens dos organismos. O pacote FORIMAGE, desenvolvido em linguagem R, possui funções para: (i) o processamento de fotomicrografias e seus meta-arquivos, (ii) a detecção do contorno dos indivíduos, (iii) a medição das dimensões dos eixos das carapaças, (iv) a realização de cálculos volumétricos e (v) a estimativa da biomassa de espécimes com base em fatores de conversão disponíveis na literatura. A comparação entre os valores de área total obtidos pelo processamento automatizado do pacote e aqueles determinados a partir de medidas manuais convencionais levaram a valores estatisticamente semelhantes para a maioria dos táxons analisados. As recomendações de qualidade de imagem descritas no pacote devem ser seguidas para manter a acurácia das mensurações. O pacote é uma ferramenta de código aberto que orienta a aquisição de dados biométricos através do ambiente R. Ele (i) reduz a subjetividade na obtenção das métricas, permitindo a comparação de resultados entre diferentes grupos de pesquisa; (ii) minimiza o tempo de processamento em cerca de 98%, otimizando a aquisição de maior quantidade de dados; (iii) sintetiza e hierarquiza as etapas metodológicas envolvidas na determinação de biomassa. Os resultados desse estudo demonstram a viabilidade desta abordagem metodológica e usabilidade do pacote FORIMAGE para a estimativa de biomassa de foraminíferos, e sua possível aplicação em diversas áreas da Biologia, Oceanografia e Paleontologia.

Palavras-chave: análise de imagem, microfósseis, biometria, otimização, carbono orgânico, unicelular, biomassa, fluxo de energia

ABSTRACT

Foraminifera have an important role in energy transfer and carbon consumption on the sea floor. The effective contribution of these organisms as heterotrophic components of benthic assemblages is often neglected by the lack of viable quantitative methods that describe their biomass with accurate and realistic estimations. The currently available nondestructive methods, such as the biovolume, are limited by measurement effort and time-consumption procedures. Considering these issues, this study aimed to develop an automated procedure for foraminiferal biomass data acquisition. The FORIMAGE package, developed in R programming language, combines functions to (i) read image files and metafiles, (ii) detect object's outline, (iii) measure specimens' dimensions, (iv) perform volumetric analysis, and to (v) estimates specimen's biomass based on conversion factors available in the literature. The comparisons between the total area obtained with the automated processing and those determined from conventional manual measurements led to statistically similar values for most analyzed taxa. The image quality recommendations described in this study should be followed to maintain the measurements accuracy. The package is an open source tool that guides biometric data acquisition through R environment. It (i) reduces subjectivity in obtained metrics allowing comparison between distinct research studies; (ii) minimizes processing time by 98%, optimizing the acquisition of greater amount of data; (iii) synthesizes and hierarchizes the methodological steps involved in biomass determination. The results showed here demonstrate the feasibility of this methodological approach and FORIMAGE usability to foraminiferal biomass estimation and its possible application in microfossils and other unicellular groups studies that can be used as a proxy of ocean (paleo) productivity.

Keywords: image analysis, microfossils, biometry, optimization, organic carbon, unicellular, biomass, net energy flux

LISTA DE FIGURAS

Figure 1. Package basic workflow. Green and blue box indicate module 1 and 2, respectively. PCO = percent cell occupancy of the test.	35
Figure 2. Measurement comparison of an <i>Ammonia</i> specimen (foram2) with the outline of area measurement. a. manual measurement (red). b. automatic measurement (green).	40
Figure 3 Bland Altman plot for comparison of area measurement methods. Continuous line indicates mean of differences and dashed lines indicate limits of agreement.	41
Figure 4. Foraminifera image resulting from the <i>measure</i> function represented in data frame by filename: foram1.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Modelos geométricos aplicados por Freitas; Bacalhau; Disaró (2019).	25
Table 1: Geometric models codes available to inform in <i>model</i> argument of <i>volume.total</i> function and their required dimensions for input in <i>data</i> argument. Abbreviations: d_one = major diameter, d_two = minor diameter, h = height, l = length, w = width.	37
Table 2 Datasets available to examples and tests.	42

MATERIAL SUPLEMENTAR

Table S1 Dataset (<i>data_pco</i>) available within forImage package. Foraminiferal genera percent (mean \pm SD) of cell occupancy (PCO) of the test and its correspondent geometric model.	53
Figure S1 Foraminiferal surface area (mean \pm SE) of estimated using different methods. Light blue interval bars indicate 95% CI estimated by bootstrapping.	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1	FORAMINIFERA.....	19
1.2	ESTIMATIVA DE BIOMASSA: METODOLOGIA.....	21
2	JUSTIFICATIVA.....	28
2.1	PERGUNTAS DE PESQUISA.....	28
2.2	OBJETIVOS	29
2.2.1	Objetivo geral.....	29
2.2.2	Objetivos específicos	29
3	FORIMAGE: R package for foraminiferal biometry and biomass estimation	31
	Abstract.....	32
3.1	Introduction.....	32
3.2	Package Description.....	34
3.2.1	Module 1 – image analysis, outlines and measurements..	35
3.2.2	Module 2 – volumetric calculations and biomass estimative	36
3.3	Validation.....	39
3.4	Test Datasets	42
3.5	Package Examples.....	43
3.6	Conclusion	46
	Acknowledgements.....	46
	Availability.....	47
	References	47
4	CONCLUSÃO GERAL.....	57
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 FORAMINIFERA

Foraminíferos são organismos heterotróficos unicelulares pertencentes ao supergrupo Rhizaria (NIKOLAEV et al., 2004). Eles ocorrem em larga escala em todo o ambiente marinho. Sua distribuição varia desde águas rasas até ambientes profundos, ambientes de transição como estuários e manguezais, e as áreas abissais. Algumas espécies têm modo de vida planctônico, porém a maioria é bentônica. Foraminíferos bentônicos podem ter vida livre ou viver aderidos à grãos de sedimento, ou a outros organismos vivos.

A característica mais conspícua em um foraminífero é sua carapaça externa, que pode ser composta de carbonato de cálcio secretado, material orgânico ou aglutinado a partir de partículas sedimentares. As carapaças têm uma ou mais câmaras e, normalmente, possuem estruturas como espinhos, sulcos e ranhuras, que são importantes na identificação das espécies (PARKER, 2017), mas não modificam o formato da célula em seu interior (HOTTINGER, 2006).

Ao contrário, a morfologia da carapaça, o arranjo e o padrão de crescimento das câmaras, que também são determinantes na separação de morfotipos, modificam o formato da célula (HOTTINGER, 2006). A organização das câmaras no crescimento de um foraminífero pode ser uniserial, biserial, triserial ou miliolar, ou ainda ter uma organização mista, com mais de uma forma de organização das câmaras, e estas podem se dispor em um ou mais planos, com diferentes curvaturas, resultando numa carapaça planispiral, trocospiral, linear, flabeliforme ou outra forma, e apresentar-se evoluta ou involuta.

De acordo com Hottinger (2000), as características morfológicas de um organismo representam importantes instrumentos de interação com o ambiente ao seu redor. A forma da carapaça é influenciada pelas características do seu ambiente natural, quando considerada a posição da abertura, o formato geral da carapaça reflete a uniformidade do meio em que reside (HOTTINGER, 2000). Como a diversidade de formas varia com as condições do meio, as expressões fenotípicas refletem os fatores ambientais dominantes em determinada região (HEALY-WILLIAMNS; WILLIAMS, 1981).

Um micro-habitat pode ser caracterizado como um microambiente com características físicas, químicas e ecológicas condicionantes da sobrevivência de determinados táxons (JORISSEN, 1999). As variações morfológicas são, dessa forma, utilizadas há muito tempo para

compreender e caracterizar os habitats dos foraminíferos (CORLISS, 1985). Devido à sua alta abundância, diversidade, a ampla distribuição em ambientes marinhos e transicionais, foraminíferos são amplamente utilizados como bioindicadores. Além disso, sua capacidade de preservação nos registros geológicos também permite sua utilização na caracterização de paleoambientes (JONES, 2014). Eles respondem prontamente a mudanças ambientais, mesmo em amostras com pouco volume (FRONTALINI; COCCIONI, 2011; MOJTAHID; JORISSEN; PEARSON, 2008). Podem indicar condições naturais do meio como temperatura, salinidade, profundidade, características sedimentares, entre outros fatores (BOLTOVSKOY, 1959; DE RIJK et al., 2000; DEBENAY et al., 1998; GOODAY; JORISSEN, 2012; HAYWARD; GRENFELL; SCOTT, 1999; SZAREK et al., 2006); também podem responder às mudanças causadas pela ação humana, como aporte de esgoto, metais pesados e pesticidas (ALVE, 1995; DIJKSTRA et al., 2017; FRONTALINI et al., 2011; LUIZ et al., 2007).

Os foraminíferos possuem um papel importante no ciclo e remineralização do carbono no ambiente marinho. São capazes de ingerir grandes quantidades de carbono rapidamente em áreas profundas (NOMAKI et al., 2005). Podem ser carnívoros, herbívoros ou omnívoros, além de realizar parasitismo e simbiose. Alimentam-se de diferentes partículas e detritos, sendo capazes de mudar sua estratégia de alimentação de acordo com a disponibilidade de alimento e o fluxo local de matéria orgânica (CULVER; LIPPS, 2003; GOODAY et al., 1992; JEFFREYS et al., 2015). Também servem de alimento para uma grande variedade de organismos (GOLDBECK; HOUBEN; LANGER, 2005; GUDMUNDSSON et al., 2003; LANGER; LIPPS; MORENO, 1995), e são um importante componente nas teias alimentares, atuando como um elo trófico entre pequenas partículas ou produtores primários (detritos, bactérias, microalgas) e metazoários consumidores (NOMAKI et al., 2008).

A distribuição e a composição das espécies de foraminíferos estão relacionadas, entre outros fatores, ao *input* de matéria orgânica no ambiente (GOODAY; JORISSEN, 2012; NOMAKI et al., 2005), sendo fortemente influenciadas pela produtividade superficial dos oceanos e consequente fluxo de carbono orgânico nos leitos marinhos (ALTENBACH; SARNTHEIN, 1989). Em áreas profundas, a biomassa de foraminíferos constitui mais de 50% da biomassa total da meiofauna (ROWE et al., 2008). Em áreas rasas, como planícies de maré, chegam a compor 84% da biomassa total de protistas (LEI et al., 2014). O reconhecimento de variações na composição das espécies e de suas

respectivas biomassas pode auxiliar na compreensão dos processos que regem o fluxo de carbono, e assim avaliar suas flutuações ao longo do registro fóssil (ALTENBACH et al., 1999; ALTENBACH; STRUCK, 2001; CORLISS; CHEN, 1988). A incorporação da biomassa de foraminíferos em curvas ABC permite a detecção de perturbações no ambiente marinho e pode, portanto, auxiliar na interpretação da resposta de diferentes espécies a mudanças ambientais (DISARÓ et al., 2017; MARTINS et al., 2019).

1.2 ESTIMATIVA DE BIOMASSA: METODOLOGIA

A biomassa de foraminíferos pode ser definida como o peso ou volume da matéria orgânica viva em uma unidade de área ou volume de sedimento (MURRAY, 2006). Ela pode ser expressa em miligramas de carbono orgânico por metros quadrado – $\text{mgC}_{\text{org}}\cdot\text{m}^{-2}$ (ALTENBACH; STRUCK, 2001; DISARÓ et al., 2017), centímetro cúbico - $\text{mgC}_{\text{org}}\cdot\text{cm}^{-3}$ (KORSUN, 2002), microgramas de carbono orgânico por micrometro cúbico - $\mu\text{gC}_{\text{org}}\cdot\mu\text{m}^{-3}$ (FREITAS, 2016; FREITAS; BACALHAU; DISARÓ, in prep.) ou microgramas de carbono orgânico por centímetro cúbico - $\mu\text{gC}_{\text{org}}\cdot\text{cm}^{-3}$ (THOMSEN; ALTENBACH, 1993). A variabilidade de unidades para expressar a biomassa se reflete na diversidade de métodos para sua estimativa.

A biomassa pode ser estimada em peso seco total ou livre de cinzas para subtração da matéria inorgânica das carapaças, a partir da combustão a 500°C (WIDBOM, 1984). Atualmente, essa técnica é pouco utilizada para foraminíferos por ser pouco acurada. Devido ao tamanho reduzido das carapaças, é necessária uma grande quantidade de organismos para se obter uma estimativa de peso confiável, mesmo com o uso de uma balança de alta precisão (SAIDOVA, 1966). Além disso, por não separar de forma acurada a matéria orgânica da parte inorgânica (biomineralizada) da carapaça (DELACA, 1986), estimativas de peso superestimam a importância de espécies com carapaças pesadas (GOODAY et al., 1992).

DeLaca (1986) utilizou o cálculo da concentração de ATP celular dos foraminíferos, associada ao conteúdo de carbono orgânico (carbono: ATP = 300), como indicador de biomassa, com o intuito de obter a quantidade de material vivo de modo mais acurado. De modo similar, Altenbach (1985, 1987) aplicou um método de oxidação direta do carbono orgânico através de um analisador infravermelho, para quantificar a biomassa celular dos foraminíferos com um alto nível de acurácia. Apesar dos métodos de DeLaca (1986) e Altenbach (1987)

serem mais acurados por quantificarem a biomassa com baixo grau de incerteza (de modo direto no caso de Altenbach *op. cit.*), esses métodos não preservam as amostras para outras análises, caracterizando-se como métodos destrutivos. Além disso, as análises realizadas pelos métodos de quantificação direta da biomassa dependem de equipamentos que podem ter difícil acesso, aumentando o custo e o tempo associado ao processamento das amostras.

Movellan et al. (2012) aplicaram um método não-destrutivo de estimativa da biomassa a partir da quantificação da biomassa proteica por nano-espectrofotometria. Apesar dos autores classificarem seu método como não-destrutivo, ele é baseado no uso de sonicador com reagentes para remover o material citoplasmático da carapaça. Desta forma, se usado com alta intensidade pode quebrar facilmente carapaças frágeis. Além disso, para a aplicação do método são necessárias amostras de material vivo congelado, portanto, de difícil aplicação em material preservado em álcool ou formol, ou ainda em material mineralizado para estudo de paleoambientes. Como indicado por Movellan et al. (2012), os métodos testados necessitam de aplicação individual; e segundo os autores, espécies maiores e robustas sofrem menos com o uso do sonicador. Entretanto, estudos de comunidade de foraminíferos requerem o uso de um método único para toda a associação, visando facilitar comparações e análises estatísticas (SCHÖNFELD et al., 2012).

Uma maneira prática e não destrutiva de calcular a biomassa de foraminíferos é a partir do biovolume, baseado em modelos geométricos que representam a forma da carapaça (FREITAS; BACALHAU; DISARÓ, 2019; MURRAY, 2006). Saidova (1966) foi uma das primeiras autoras a utilizar o volume do interior da carapaça para estimar a biomassa. A autora visualizou diferenças consideráveis de biomassa entre profundidades na Trincheira de Kuril–Kamchatka, com valores de biomassa entre 2 a 10g.m⁻². Murray (1968) utilizou modelos geométricos simples para estimar a biomassa, em seu cálculo, o volume total de uma espécie em uma amostra foi obtido a partir das dimensões médias, multiplicando pelo número total de indivíduos na amostra. Outros estudos utilizaram modelos simples para calcular o volume da carapaça (BROUWER et al., 2016; GERLACH; HAHN; SCHRAGE, 1985; KORSUN et al., 1998). Ao invés de desenvolver fórmulas de modelos mais complexos, associar a carapaça a modelos simples pode facilitar as estimativas de biomassa (MURRAY, 1973). Entretanto, a aplicação de modelos inadequados pode superestimar ou subestimar o volume das carapaças. Segundo Hannah, Rogerson e Laybournparry (1994) algumas inadequações podem superestimar de seis a dez vezes o volume da

carapaça. A comunidade de foraminíferos possui alta diversidade de espécies e formas, traduzidas em medidas biométricas como tamanho, volume e biomassa, que por sua vez permitem inferir diferentes estratégias de assimilação de energia (MALERBA; WHITE; MARSHALL, 2018; WUKOVITS et al., 2018). Logo a adequação de modelos complexos pode ser necessária para tornar a estimativa da biomassa mais precisa (FREITAS, 2016; FREITAS; BACALHAU; DISARÓ, in prep.).

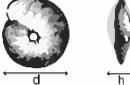
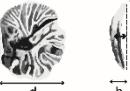
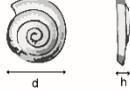
Além da forma geral da carapaça, o cálculo do biovolume requer a avaliação da quantidade de material citoplasmático que ocupa o espaço interno da carapaça. Apesar de alguns estudos considerarem a carapaça totalmente preenchida (KEATING-BITONTI; PAYNE, 2016, 2017; KORSUN et al., 1998; MURRAY, 1968; MURRAY; ALVE, 2000), a carapaça não é inteiramente ocupada pelo protoplasma (ALTENBACH, 1987). O primeiro autor a quantificar diretamente o percentual de ocupação foi Altenbach (1987). Utilizando uma espécie de foraminífero como modelo, ele observou que o percentual de ocupação da carapaça variou de 10-62%, com média de 35%. Outros autores adotaram percentuais de ocupação médios de 32% e 75%, baseando-se em observações diretas (DA SILVA, 2013; GERLACH; HAHN; SCHRAGE, 1985; HANNAH; ROGERSON; LAYBOURNPARRY, 1994; VICENTE, 2012). Contudo, estudos posteriores passaram a adotar o percentual médio de 75% para todas as espécies e ambientes, desconsiderando a variabilidade natural existente (CESBRON et al., 2016; GESLIN et al., 2011; JAUFFRAIS et al., 2017; THOMSEN; ALTENBACH, 1993). Como cada espécie possui particularidades quanto ao espaço interno disponível para ocupação, à forma geral da carapaça e ao tamanho da célula, simplificações ou generalizações do percentual de ocupação podem aumentar consideravelmente o erro em estudos de áreas com alta diversidade. O uso de modelos específicos por espécie ou gênero pode melhorar as estimativas e diminuir o erro nestes casos (FREITAS, 2016; FREITAS; BACALHAU; DISARÓ, in prep.), vide Tabela 1.

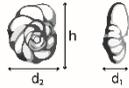
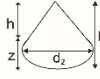
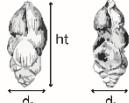
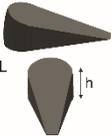
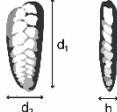
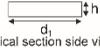
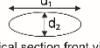
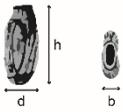
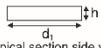
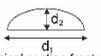
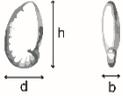
Embora o método de Altenbach (1987) seja mais preciso no cálculo da biomassa de carbono orgânico para foraminíferos, a técnica do biovolume pode ser bastante realista quando realizada com medidas precisas (FREITAS, 2016; FREITAS; BACALHAU; DISARÓ, in prep.), principalmente quando empregadas ferramentas tecnológicas que podem reduzir o esforço e facilitar as estimativas de biomassa.

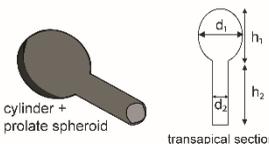
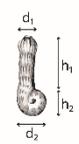
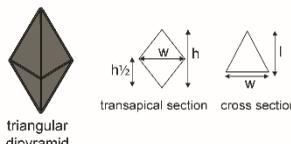
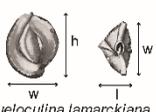
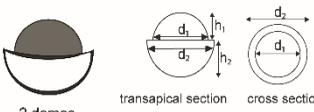
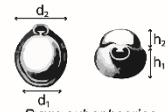
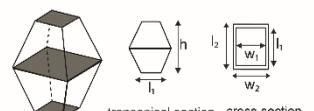
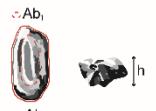
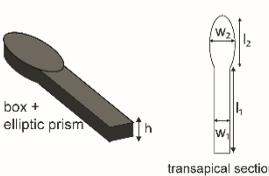
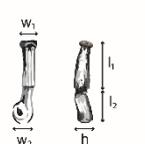
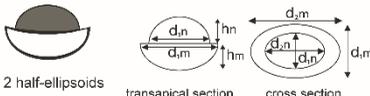
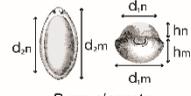
Exemplos de tais ferramentas podem ser encontrados em estudos aplicados ao cálculo do biovolume de micro-organismos planctônicos. Algumas destas são baseadas na adequação de modelos geométricos

simples e complexos, e outras utilizam ferramentas de classificação não-supervisionada com o cálculo automatizado (*e.g.* ÁLVAREZ; LÓPEZ-URRUTIA; NOGUEIRA, 2012; GORSKY et al., 2010). No entanto, essas ferramentas têm características e aplicações específicas (vide SACCÀ, 2017), e, muitas vezes, por não possuírem código aberto ou integração com outras plataformas, têm utilização restrita a tipos de amostras ou grupos específicos (CARPENTER; KAMENTSKY; ELICEIRI, 2013). Desse modo, a intenção deste estudo é preencher lacunas referentes à usabilidade de ferramentas para o cálculo do biovolume, para ampliar e permitir sua aplicação, adaptação e interação com outros grupos taxonômicos e plataformas.

Tabela 1 Modelos geométricos aplicados por Freitas; Bacalhai; Disaró (2019).

Código	Forma (em 3D) e medidas simples (em cortes)	Equações de volume (V)	Espécie representativa
1-HL	 sphere  transapical section	$V = \frac{\pi}{6} d^3$	 <i>Psammosphaera fusca</i>
2-SL	 half sphere  transapical section  cross section	$V = \frac{\pi}{12} d^3$	 <i>Cibicides aknerianus</i>
3-HL	 prolate spheroid  transapical section  cross section	$V = \frac{\pi}{6} h d^2$	 <i>Archaias angulatus</i>
4-HL	 cone  transapical section  cross section	$V = \frac{\pi}{12} h d^2$	 <i>Amphistegina</i> spp*
5-HL	 double cone  transapical section  cross section	$V = \frac{\pi}{12} h d^2$	 <i>Remaneicella gonzalezi</i>
6-FS	 paraboloid  transapical section  cross section	$V_1 = \frac{\pi}{8} h_2 d^2$ $V_2 = \frac{\pi}{8} h_x d^2$ $V = V_2 - V_1$	 <i>Remaneicella gonzalezi</i>
7-FS	 dome  transapical section  cross section	$V = \frac{\pi}{24} h(4h^2 + 3d^2)$	 <i>Discorbinella minuta</i>
8-HL	 cylinder  transapical section  cross section	$V = \frac{\pi}{4} h d^2$	 <i>Planispirillina denticulogranulata</i>

Código	Forma (em 3D) e medidas simples (em cortes)	Equações de volume (V)	Espécie representativa
9-HL/SL	 cylinder + 2 half spheres	  transapical section cross section	$V = \pi h^2 \left(\frac{d}{4} - \frac{h}{12} \right)$  <i>Elongobula parallela</i>
10-HL	 ellipsoid	  transapical section cross section	$V = \frac{\pi}{6} h d_1 d_2$  <i>Ammonia parkinsoniana</i>
11-FS	 elliptic cone	  transapical section cross section	$V = \frac{\pi}{12} h d_1 d_2$  <i>Sahulia conica</i>
12-V	 cone + half ellipsoid	  transapical section cross section	$V = \frac{\pi}{12} d_1 d_2 (h + z)$ $= \frac{\pi}{12} d_1 d_2 h t$  <i>Angulogerina cf. occidentalis</i>
13-HL/SL	 gomphonemoid	   apical section front view apical section side view transapical view from base	$V \approx \frac{d_1 d_2}{4} [d_1 + \left(\frac{\pi}{4} \cdot 1 \right) d_2] \operatorname{asin} \left(\frac{h}{2d_1} \right)$  <i>Bolivina paula</i>
14-HL	 prism on elliptic base	  apical section side view apical section front view	$V = \frac{\pi}{4} h d_1 d_2$  <i>Articulina atlantica</i>
15-HL	 half- elliptic prism	  apical section side view apical section front view	$V = \frac{\pi}{4} h d_1 d_2$  <i>Nonioninoides grateloupii</i>

Código	Forma (em 3D) e medidas simples (em cortes) Geometric model	Equações de volume (V) Formulas	Espécie representativa Representative species
16-FS	 cylinder + prolate spheroid transapical section	$V = \frac{\pi}{6} h_1 d_1^2 + \frac{\pi}{4} h_2 d_2^2$ $= \frac{\pi}{12} (2h_1 d_1^2 + 3h_2 d_2^2)$	 <i>Monalysidium acicularis</i>
17-FS	 triangular dipyrmaid transapical section cross section	$V = \frac{2}{3} Ab h^{1/2}$ $= \frac{1}{3} \frac{(l w)}{2} h$	 <i>Quinqueloculina lamarkiana</i> , s
18-FS	 2 domes transapical section cross section	$V = \left[\frac{\pi}{24} h_1 (4h_1^2 + 3d_1^2) \right]$ $+ \left[\frac{\pi}{24} h_2 (4h_2^2 + 3d_2^2) \right]$	 <i>Pyrgo subsphaerica</i>
19-FS	 double truncated pyramid transapical section cross section	$V = \frac{2}{3} (Ab_1 + Ab_2 + \sqrt{Ab_1 Ab_2}) h^{1/2}$ $= \frac{1}{3} [(w_1 l_1) + (w_2 l_2) + \sqrt{(w_1 l_1)(w_2 l_2)}] h$	 <i>Quinqueloculina moynensis</i> , s
20-SL	 box + elliptic prism transapical section	$V \approx h \left(l_1 w_1 + \frac{\pi}{4} l_2 w_2 \right)$	 <i>Articulina paucicostata</i>
21-FS	 2 half-ellipsoids transapical section cross section	$V = \left(\frac{\pi}{12} h_n d_{1n} d_{2n} \right)$ $+ \left(\frac{\pi}{12} h_m d_{1m} d_{2m} \right)$	 <i>Pyrgo elongata</i>

Abreviações: HL = modelos adaptados de Hillebrand et al.; SL = adaptados de Sun & Liu; HL/SL = modelos de Hillebrand et al. adaptados por Sun & Liu; V = adaptados de Vadrucchi, Cabrini & Basset; FS = adaptados por Freitas, Bacalhau & Disaró; d = diâmetro; h = altura; l = comprimento; w = largura; Ab = área da base; **Amphistegina* spp. representa ambos modelos 4 e 5-HL. Fonte: Freitas (2016).

2 JUSTIFICATIVA

Um dos desafios para entender o funcionamento do ecossistema é considerar a complexidade do fluxo de energia dentro de múltiplos níveis tróficos. A maioria dos estudos se concentra em modelos de redes alimentares baseados em níveis tróficos de uma única classe de tamanho ou um número de grupos de espécies reduzido, que frequentemente subestimam a importância de foraminíferos no funcionamento do ecossistema (KELLY-GERREYN et al., 2014; PIOT; NOZAIS; ARCHAMBAULT, 2014; WEI et al., 2010; YOOL et al., 2017). Além disso, diferentes classes de tamanho geralmente possuem produtividade e eficiência energética distintas (MALERBA; PALACIOS; MARSHALL, 2018; MALERBA; WHITE; MARSHALL, 2018). De modo que a redução do tamanho de organismos pode afetar os fluxos de energia e o funcionamento do ecossistema. Assim, a ausência de grupos com diferentes níveis de classe ou tróficos pode subestimar o fluxo energético e tirar conclusões irrealistas (PIOT; NOZAIS; ARCHAMBAULT, 2014). A otimização de métodos de amostragem e visualização microscópica pode, então, revelar a contribuição efetiva de foraminíferos na biomassa bêntica do fundo marinho. No entanto, os métodos não destrutivos mais utilizados são limitados pelo esforço de medição que geralmente envolvem procedimentos demorados e trabalhosos. Desta forma, uma abordagem computacional baseada no processamento de fotomicrografias digitais, somada ao cálculo automatizado do biovolume pode minimizar o tempo de processamento, aumentar a eficiência e diminuir o viés humano nas medições das carapaças, o que permite ampliar a aplicação da biomassa de foraminíferos em diferentes estudos e modelos ambientais, incluindo a perda de produtividade e complexidade trófica em virtude de impactos antrópicos e mudanças climáticas globais.

2.1 PERGUNTAS DE PESQUISA

- Como tornar a estimativa de biomassa de foraminíferos mais amigável para não especialistas e assim ampliar sua aplicabilidade em estudos oceanográficos, tais como monitoramento ambiental e avaliação de impactos?
- Como diminuir o tempo e o esforço da aquisição de dados de biomassa de foraminíferos para torná-la mais eficiente mantendo sua acurácia?

- Quais funções e respectivos argumentos são necessários para medição, cálculo e estimativa automatizada da biomassa de foraminíferos?

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

O objetivo do trabalho é desenvolver uma estratégia de automatização para aquisição de dados de biomassa de foraminíferos através de um pacote desenvolvido em ambiente R. A otimização do levantamento desses dados tem o intuito de auxiliar estudos de modelagem ecológica envolvendo a resposta de foraminíferos bentônicos aos efeitos das mudanças ambientais e contribuir para o uso do grupo como ferramenta em estudos dos sistemas marinhos.

2.2.2 Objetivos específicos

- Construir um modelo conceitual de aplicação do pacote, considerando sua funcionalidade e interatividade com outras aplicações;
- Desenvolver funções baseadas em reconhecimento de padrões em fotomicrografias associados às características morfológicas das carapaças para o cálculo automatizado de seu volume;
- Avaliar o desempenho do sistema através de uma análise comparativa entre medidas obtidas com o pacote e dados já disponíveis.

FORIMAGE: R PACKAGE FOR FORAMINIFERAL
MEASUREMENTS AND BIOMASS ESTIMATION

Este capítulo apresenta o conteúdo do artigo que compõe esta dissertação e foi submetido à revista *Computers and Geosciences* em 15 de março de 2019.

3 FORIMAGE: R package for foraminiferal biometry and biomass estimation

Thaise R. Freitas^{*1,2, a}, Eduardo T. Bacalhau^{3,b}, Sibelle T. Disaró^{4, c} and Carla Bonetti^{2,d}

1 Postgraduate Program in Oceanography, Center of Physical, Mathematics and Oceanography Sciences, Federal University of Santa Catarina, CEP 88040-000, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. E-mail address: thaisercardo.freitas@gmail.com

2 Coastal Oceanography Laboratory (LOC), Federal University of Santa Catarina, CEP 88061-600, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Email address: carla.bonetti@ufsc.br

3 Centre for Marine Studies (CEM), Federal University of Paraná, Pontal do Paraná, Paraná, Brazil. Email address: bacalhau@ufpr.br

4 Laboratory of Foraminifera and Environmental Micropaleontology (LaFMA), Museu de Ciências Naturais (MCN), Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil. Email address: stdisaro@ufpr.br

* Corresponding author: Thaise R. de Freitas, Tel: 55 48 998030534; Email address: thaisercardo.freitas@gmail.com (T. Freitas)

^a TF conceived the project ideas, implemented the first version, and led the manuscript writing.

^b EB conceived the idea, supported the package revision and contributed in writing.

^c ST contributed with methods ideas and revised critically the manuscript for intellectual content.

^d CB conceived the idea, contributed with the manuscript writing and final revisions.

All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication. The authors declare no conflict of interests

Abstract

Despite its known ecological importance, the role of Foraminifera in the trophic structure of marine communities relies on quantitative methods to describe its biomass that is often neglected due to challenges associated with the assessment of accurate estimation. The currently available nondestructive methods are limited by measurement effort, time-consumption and costly indirect procedures. Considering these issues, this paper presents the R package FORIMAGE, to (i) read image files and metafiles, (ii) detect object's outline, (iii) measure specimens' dimensions, (iv) perform volumetric analysis, and to (v) estimates specimen's biomass based on conversion factors available on the literature. FORIMAGE is an open source tool to guide biometric data acquisition in individual, population or community level through R environment. The comparison between the total area values obtained from proposed method and ones determined from conventional measures shows that there is substantial accuracy in surface area measured by the package. Our results demonstrated the feasibility of this methodological approach to foraminiferal biomass estimation and its possible application in microfossils and other unicellular groups studies that can be used as a proxy of ocean (paleo) productivity.

Keywords: image analysis, microfossils, biometry, optimization, organic carbon, unicellular, biomass, net energy flux

3.1 Introduction

Understand carbon flux driven processes on marine food webs is pivotal since benthic and pelagic systems are strongly linked by energy and matter fluxes in all marine environments. Benthic communities depend on the amount and quality of organic matter that reach the seabed from pelagic primary productivity (Altenbach and Struck, 2001; Nomaki et al., 2005a) while pelagic productivity can be boosted or attenuated by upward fluxes of nutrients, detritus, and larval dispersion from benthos (Austen et al., 2002; Griffiths et al., 2017; Raffaelli et al., 2003). Therefore, estimates of biomass and carbon flux on marine systems are essential to a better understanding of trophic relationships and human impacts on ecosystem function and services.

Rhizarians (i.e., unicellular amoeba-like organisms), among other marine microorganisms, play an important role in carbon flux through food-web by their multiple routes of carbon incorporation and export

production (Caron, 2016; Michaels et al., 1995; Stoecker et al., 2009; Worden et al., 2015). In food-poor ocean's mesopelagic environments, large rhizarians high abundances indicate the remineralization of sinking particles, contributing to carbon flux attenuation (Stukel et al., 2018). Recent studies demonstrate their ecological and biogeochemical importance (Gutierrez-Rodriguez et al., 2018), as well as their contribution in oligotrophic oceans abundance and biomass, which can reach over 50% of overall mesozooplankton biomass (Biard et al., 2016).

In benthic environments, foraminifera represent over 50% of total biomass of meiobenthic communities in deep sea (Rowe et al., 2008) and more than 84% of total protozoan biomass in brackish tidal flat areas (Lei et al., 2014). Along with their high abundance, diversity and preservation capacity, they have the potential to fulfil an important role as heterotrophic components of benthic assemblages in recent and past environments, through energy transfer and carbon consumption on the sea floor (Nomaki et al., 2008, 2005b, 2005a). Despite acknowledging their major role in carbon flux in seabed, foraminifera are often neglected in studies of carbon in seafloor, which give more frequent focus to meio- and macrobenthic metazoans ecology (Gambi et al., 2017; Hoffmann et al., 2018; Kelly-Gerreyn et al., 2014; Soltwedel, 2000; Wei et al., 2010; Yool et al., 2017). These studies pointed out difficulties and methodological restrictions that involve the determination of biomass in this biological group, related to distinguishing living from dead organisms and reliable estimates of biomass.

The direct measurement of foraminiferal biomass often requires destructive analytical methods (Altenbach, 1987; DeLaca, 1986; Movellan et al., 2012), which hampers future analysis or even the use of museum samples. Indirect non-destructive methods, such as biovolume, preserve samples integrity and allows usage in paleontological studies (Freitas et al., unpublished). It also provides data useful to assess the relationship between cell size and environmental biogeochemical changes, among other uses (Brouwer et al., 2015; Jauffrais et al., 2017; Keating-Bitonti and Payne, 2018; Vasselon et al., 2018; Wukovits et al., 2018)

Although some inaccuracies in the biovolume method related to cell occupancy and the adjustment of geometric models selected for volume calculations, the natural variability of foraminifera populations biomass seems to be greater than that caused by methodological discrepancies (Altenbach and Struck, 2001). These analytical uncertainties may be minimized with the use of a more suitable geometric model and the incorporation of a species mean cell occupation (Freitas et

al., unpublished). Thus, along with data acquisition improvement, biovolume use is justifiable as a good methodological alternative to biomass estimation.

The increase in information extracted from images for biological analysis in the last few years allowed the automatization of object measurement (Eliceiri et al., 2012; Hudson et al., 2015). While manual measurement of foraminifera's dimensions is time-consuming and susceptible to researcher's bias, semi-automatic measurements from photomicrographs turn biovolume calculation faster and less subjective (Mazurkiewicz et al., 2016).

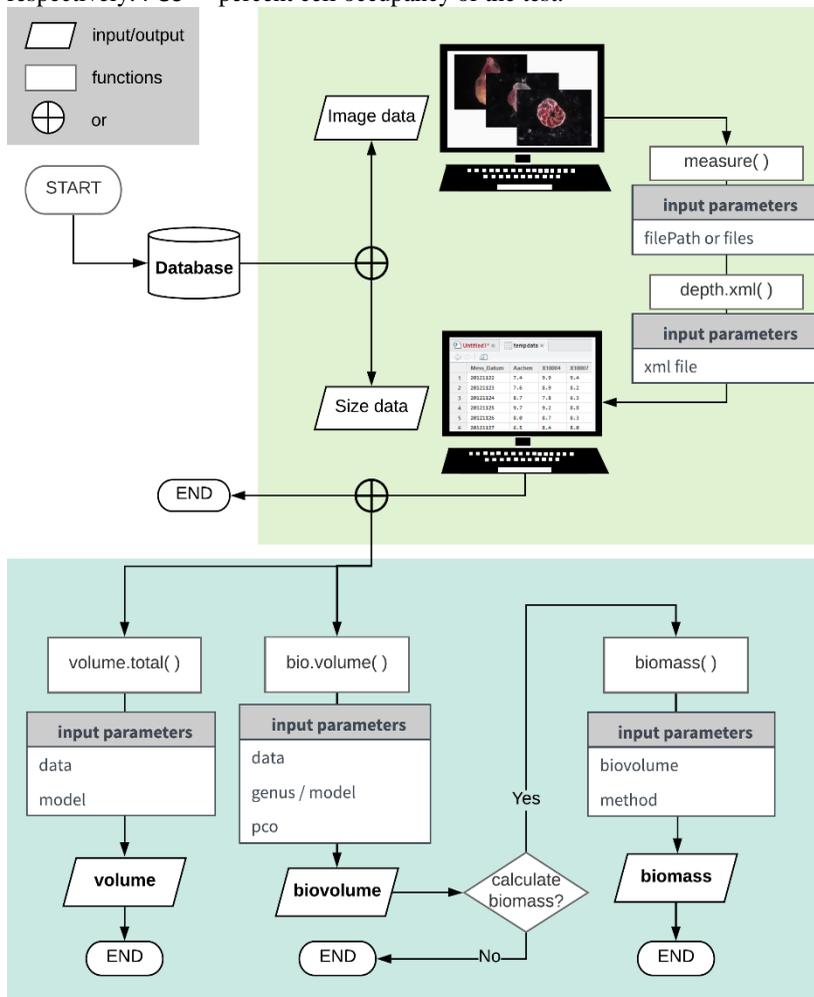
In this sense, we present herein an open-source R package with a computational approach based on photomicrographs processing and analysis to automate volume calculations, and biovolume and biomass estimation. The package FORIMAGE was developed aiming to address common issues related to foraminiferal biovolume assessment, as measurement effort and time consumption. The functions can increase the efficiency and decrease the human bias in the shell's measures, while the R environment provides interactivity with further packages for statistical analysis and to data visualization.

3.2 Package Description

The FORIMAGE package is designed to facilitate estimates of foraminiferal biomass through biovolume. The package's basic structure follows the workflow illustrated in Figure 1. Overall it comprises five functions and sixteen datasets, that has been developed in R scientific computing language (R Core Team, 2018) integrated with Python scripts via RETICULATE R package (Allaire and Ushey, 2018). Both languages encourage open source development, which can be expanded and adapted by users and developer's contribution, as well as allow interactivity with other packages for data manipulation and statistical analysis.

The functions were separated into two modules, (1) image analysis and individual's measurement, and (2) the calculation of volume, biovolume and biomass estimation. FORIMAGE workflow can start from both modules depending on the user's interest.

Figure 1. Package basic workflow. Green and blue box indicate module 1 and 2, respectively. PCO = percent cell occupancy of the test.



3.2.1 Module 1 – image analysis, outlines and measurements

The first module includes the R function *measure*, which contains image processing algorithms implemented with Python 3.5 and OpenCV 3.4.3. The function (i) reads one or multiple photomicrographs files in the informed path, (ii) reads the image metafiles (i.e., .xml files) data to retrieve the scale factor, (iii) process the images, and (iv) identify and

measure the contour and the axis to return 2D measurements and surface area.

In order to identify the region that contains the cell, a mean shift filter is applied into the photomicrographs, to flatten colour gradients and fine-grain texture, before images are converted to grayscale. A Gaussian blur filter is then added for noise removal, and a binary threshold image segmentation tool is applied for image cluster-thresholding to segment the background from the object of interest (Shapiro and Stockman, 2000). Morphological operations are applied afterwards to remove noise around and within the object. The last step is to detect and draw contours and the cell bounding box to retrieve its dimensions. The result of measure function is a data frame containing the filename, cell major and minor axis size and surface area along with a saved Portable Network Graphics (PNG) image with the outlined area and axis measured (Figure 2b). The image is saved in the working directory folder.

The *depth.xml* function can be used to (i) read the image metafiles, (ii) retrieve focus range position from extended stacked images and return the z-axis measurement. This module can be used by itself if the user only requires size data, or it can be used before the second module if the following metrics are required.

3.2.2 Module 2 – volumetric calculations and biomass estimative

The second module includes the functions *volume.total*, *bio.volume* and *biomass*. The *volume.total* function allows to calculate the total volume of unicellular organisms based on a set of geometric models (Table 1) informed as model argument. The function *bio.volume* calculates (i) the total volume of foraminifera based on pre-established geometric models for genus informed in genus argument (ii) and biovolume from calculated total volume and the percent cell occupancy (pco) of the test factor (i.e., the estimate of cell occupancy inside the shell). Lastly, (iii) the *biomass* function returns the organic carbon biomass from the resulted biovolume data using cell density values available from the literature as a conversion factor. These functions can be applied directly to size data gathered from the first module or to previously obtained measurements.

Table 1: Geometric model codes available to inform in `model` argument of *volume.total* function and their required dimensions for input in `data` argument. Abbreviations: `d_one` = major diameter, `d_two` = minor diameter, `h` = height, `l` = length, `w` = width.

Geometric model	<code>model</code>	Required dimension
sphere	"1h1"	<code>d_one</code>
half sphere	"2s1"	<code>d_one</code>
prolate spheroid	"3h1"	<code>h</code> , <code>d_one</code>
cone or double cone	"4h1"	<code>h</code> , <code>d_one</code>
paraboloid	"6fs"	<code>h</code> , <code>d_one</code>
dome	"7fs"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
cylinder	"8h1"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
ellipsoid	"10h1"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
elliptic cone	"11fs"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
cone + half-ellipsoid	"12v"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
gomphonemoid	"13h1s1"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
prism on elliptic base	"14h1"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
half-elliptic prism	"15h1"	<code>h</code> , <code>d_one</code> , <code>d_two</code>
triangular dipyramid	"17fs"	<code>h</code> , <code>l</code> , <code>w</code>
area x height	"axh"	<code>h</code> , <code>area</code>

adapted from Freitas et al. unpublished

The variables names contained in the measurement input `data` for either *volume.total* or *bio.volume* functions need to be associated with the geometric model, as indicated in Table 1. These functions considerate the morphological variation of foraminifera taxa likewise its applicability options. Several studies choose to not identify foraminifera at the species level and to group the specimens at higher levels, such as Phylum, or by morphotypes. Thus, `genus` was established as an argument for *bio.volume* function. Each `genus` is associated to its corresponding geometric model, according to models adapted from Freitas et al. (unpublished), which are primarily based on microalgae models developed by (Hillebrand et al., 1999; Sun and Liu, 2003; Vadrucchi et al., 2007). Due to morphotypes variability of certain genera, as is the case of *Pyrgo*, *Quinqueloculina* e *Triloculina*, the `model` argument can be also specified in *bio.volume* function. The correspondence table of suggested geometric models to all currently available foraminifera genera is in the Supplementary Material (Table S1).

As most foraminiferal tests (shell) are not entirely occupied by protoplasm, to calculate biovolume is necessary to inform the percent cell occupancy (pco) of the test. In *bio.volume* function the pco value can be informed for each specimen within the `data` argument or as an average value with `pco` argument. The *bio.volume* function also contains the mean pco for 73 foraminifera genera. By indicating one of the available genera, the function calculates the volume based on pre-established corresponding `model` and the biovolume based on respective genus average pco. In cases where measuring the protoplasm occupation is not possible or if this data is not available the recommend pco value is 0.76. This value is similar to that used by other studies (Hannah et al., 1994; Jauffrais et al., 2017) and is based on the mean calculated for 232 foraminifera taxa (Freitas et al. unpublished).

The *biomass* function converts biovolume (provided in cubic micrometres) into organic carbon biomass through a cell density value as a conversion factor. The resulting biomass values are expressed in $\mu\text{gC}_{\text{org}}\cdot\text{ind}^{-1}$. Different options of biovolume conversion factors for biomass were included in the function. These have been applied to a wide diversity of nano, micro and macro organisms, including foraminifera or other similar groups (Gifford and Caron, 2000). To specify the conversion factor via the `method` argument, the following arguments can be entered:

"*saidova*": The conversion factor of $1.027\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ was adopted by Saidova (1966) for deep-sea benthic foraminifera, who considered the sea water specific gravity in deep waters.

"*strathmann*": Strathmann (1967) determined conversion equations using calculated cell densities for several phytoplankton groups. The density used in the function was $0.110\text{ pgC}_{\text{org}}\cdot\mu\text{m}^{-3}$, estimated by the carbon: volume ratio for coccolithophorids among other phytoplankton species. This factor was used by other authors to evaluate the contribution of foraminifera and other groups to the production of particulate organic carbon (Eppley et al., 1992; Wassmann et al., 2000)

"*gerlach*": The cell density adopted by Gerlach; Hahn; Schrage (1985) for meiofauna metazoans is $1.13\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ wet mass per cubic centimetre, assuming 10% as organic carbon contained in the cell. This relation has been already used to estimate foraminifera biomass (Disaró et al., 2017).

"*turley*": The Turley; Newell; Robins, (1986) conversion factor of $0.132\text{ pgC}_{\text{org}}\cdot\mu\text{m}^{-3}$, was calculated for marine ciliates of the genus *Euplotes*, as an evaluation of the predation relationships in the trophic chain of micro heterotrophic organisms. The authors used this factor to

compare biovolume estimated from test measurement with dry weight determinations (Hannah et al., 1994).

"putt": Putt; Stoecker, (1989) estimated the carbon: volume ratio of $0.140 \text{ pgC}_{\text{org}} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ for heterotrophic ciliates from coastal and estuarine areas of temperate regions. Their results and regression equations were used to evaluate the distribution and quantify the contribution to the organic carbon content of tintinnids and ciliates in coastal areas (Lei et al., 2014; Sai Elangovan and Padmavati, 2017). It was also used to simulate the productivity response of foraminifera populations to the feed flow available in the marine environment (Komosinski et al., 2017).

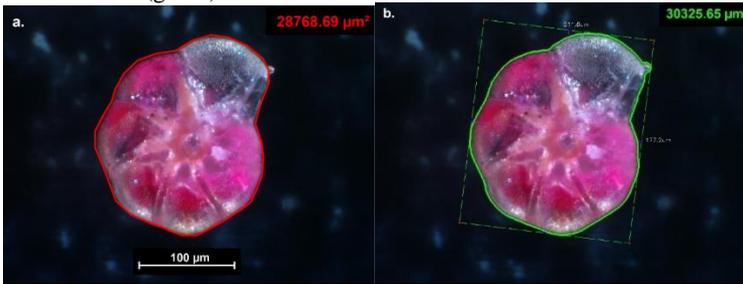
"michaels": Michaels et al. (1995) directly measured carbon:volume ratios and calculated the mean conversion factor of 0.089 (± 0.055 SD) $\text{pgC}_{\text{org}} \cdot \mu\text{m}^{-3}$ for different planktonic foraminifera species from CHN analysis. This factor was used in conjunction with the value calculated by Turley; Newell; Robins (1986) to estimate biomass and evaluate the impact of respiration rate on foraminifera $\delta^{13}\text{C}$ values by Hesse et al. (2014). This conversion factor it's the only know C:V ratio measured specifically for foraminifera. New C:V determinations across all sizes of Rhizaria are urgently needed (Stukel et al., 2018). As the use of inadequate conversion factor from biovolume to biomass remains a source of error, new determinations of the C:V relationship for benthic foraminifera are necessary.

3.3 Validation

All photomicrographs used in the package's tests and examples were obtained with a Zeiss Stereo Discovery V.20 optical microscope coupled with an AxioCam camera. These optical components allow automated acquisition of images with depth-of-field perception (Z-stack module) through extended focus. The system of illumination and contrast consists of four cold light guns or LED. The images were obtained with magnification range between 11.3-225x and the respective scales factor are available in the image metadata.

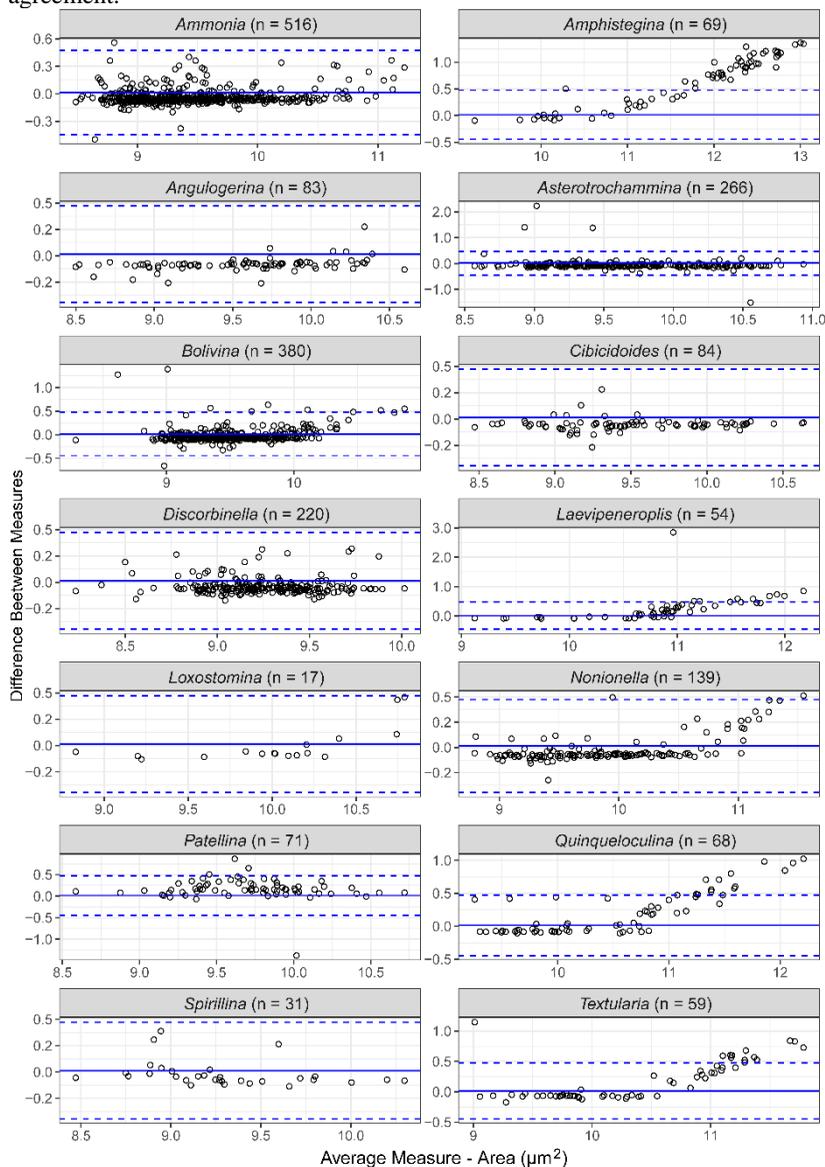
To evaluate the R - Python *measure* function performance, 2019 specimens' photomicrographs (Tagged Image File Format - TIFF), representing 14 foraminifera genera, were used as input data. All these specimens were previously measured with AXIOVISION 4.9 outline tool (see Freitas et al. unpublished). Photomicrographs with a non-uniform black background were discarded. The surface area resulted from both applications were compared to verify measurement differences and bias (Figure 2, 3).

Figure 2. Measurement comparison of an *Ammonia* specimen (foram2) with the outline of area measurement. **a.** manual measurement (red). **b.** automatic measurement (green).



Although correlation and regression analysis are frequently used to compare methods, correlation evaluates the relationship between two variables, not the differences, and it is not recommended as a method for assessing the accuracy/effectiveness between methods (Giavarina, 2015). Thereby, to evaluate the degree of agreement between the results of both measurement methods a Bland Altman plot was used (Figure 3), based on calculated bias (mean differences) and limits of agreement (95% CI of the differences), which is expected to include 95% of the differences between the two measurement methods (Bland and Altman, 1999).

Figure 3 Bland Altman plot for comparison of area measurement methods. Continuous line indicates mean of differences and dashed lines indicate limits of agreement.



Overall, the Bland Altman analysis demonstrated that the FORIMAGE *measure* function extracts outline with substantial conformity and reduced bias when compared to the manual measures. Despite the proportional bias displayed by *Amphistegina* measures as a decrease in accuracy and agreement with an increase in size, it is generally agreed that measurement error increase in proportion to the level of the measured variable (Ludbrook, 1997). These errors for this specific genus may be also related with image illumination and contrast quality. Since small contrast between objects, uneven illumination and shadows are important factors which can reduce image processing algorithms reliability including image segmentation and object detection (Butt et al., 2017). Besides, there is high variance in surface area results from the manual measurements, resulted from natural size variability within *Amphistegina* species (see Supplementary Figure S1). Although no substantial mean difference is indicated, the area variance indicated by standard error (SE) and confidence intervals (CI) increased with the application of manual measurement for most genera (Supplementary Figure S1), indicating that manual measurements are also susceptible to bias.

3.4 Test Datasets

The package contains example datasets that are used within the functions and are also available for tests. The datasets are from foraminifera genera collected, identified and measured individually in a previous work, carried out in northeastern Brazil (see Freitas et al. unpublished). A `data_pco` dataset was created for each matching geometric model of the most abundant genus, containing size data and other attributes, in order to test all functions.

Table 2 Datasets available to examples and tests.

Name	Description		
“data_pco”	mean \pm SD percent cell occupancy (pco) of the test for 73 foraminifera genera individually measured, along with matching model.		
	Genera	n	Model
“ammonia”	<i>Ammonia</i>	867	ellipsoid
“amphistegina”	<i>Amphistegina</i>	167	cone or double cone
“angulogerina”	<i>Angulogerina</i>	95	cone + half-ellipsoid
“asterotrochammina”	<i>Asterotrochammina</i>	335	paraboloid

“bolivina”	<i>Bolivina</i>	628	gomphonemoid
“cibicidoides”	<i>Cibicidoides</i>	118	half sphere
“discorbinella”	<i>Discorbinella</i>	318	dome
“laevipeneroplis”	<i>Laevipeneroplis</i>	79	prolate spheroid
“loxostomina”	<i>Loxostomina</i>	30	prism on elliptic base
“nonionella”	<i>Nonionella</i>	208	half-elliptic prism
“patellina”	<i>Patellina</i>	77	cone
“quinqueloculina”	<i>Quinqueloculina</i>	688	triangular dipyramid or ellipsoid
“rectocibicides”	<i>Rectocibicides</i>	199	area x height
“spirillina”	<i>Spirillina</i>	41	cylinder
“textularia”	<i>Textularia</i>	84	elliptic cone

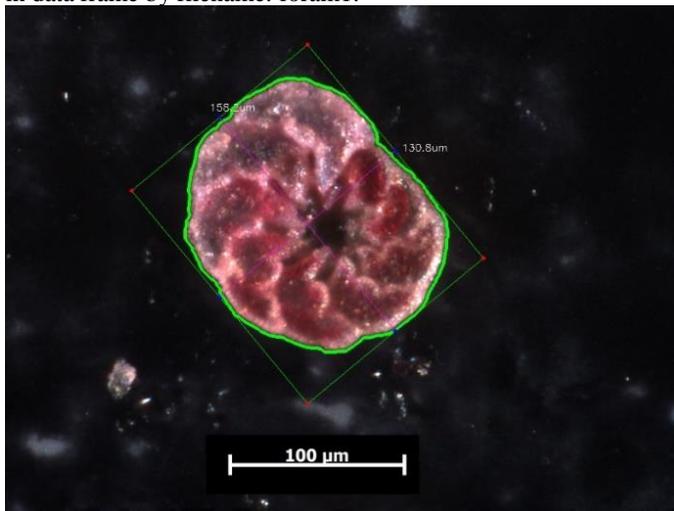
3.5 Package Examples

To illustrate FORIMAGE utilities with both workflow options we used two foraminifera photomicrographs available in the package’s external data. For module 2 examples we used a dataset available within the package (Table 2 – “ammonia”). An example of the code to measure test dimensions is presented as follows.

```
library(forImage)
dir <- system.file("extdata", package="forImage")
setwd(dir)
measure()
```

```
##      area   diamA   diamB  filename  perimeter
## 1: 17763.04 158.1690 130.8166 foram1.tif  535.1339
## 2: 30325.51 211.5867 177.1690 foram2.tif  712.3652
```

Figure 4. Foraminifera image resulting from the *measure* function represented in data frame by filename: foram1.



The resulting data frame from *measure* function contains the individuals surface area, major and minor axis dimensions. The function also saves the measured image files (Figure 2b and 4) in a selected path. The images metafiles can be read by *depth* function to retrieve the z-axis measured with Z-stack acquisition or another method. If there are multiple metafiles to read, it is required to list all XML files and apply the *depth* function.

```
files <- list.files(pattern = "\\*.xml$")
f <- lapply(files, depth.xml)
f <- data.table::rbindlist(f)
df <- df %>%
  tibble::add_column(z = f$z_depth)
```

```
##      area   diamA   diamB filename perimeter z
## 1: 17763.04 158.1690 130.8166 foram1.tif  535.1339 32
## 2: 30325.51 211.5867 177.1690 foram2.tif  712.3652 72
```

The *volume.total* function is applied in sequence to Ammonia dataset that contains measured individual major and minor diameter, height, total surface area, and calculated pco.

```
data("ammonia")
volume.total(ammonia, model = "10h1")
```

```
## # A tibble: 867 x 9
##   species      ind      h d_one d_two  area  pco      vol
##   <chr>      <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl>
## 1 aparkinsoniana 1 124.    52 121. 11280. 1    410853.
## 2 aparkinsoniana 2 113.    64 112.  9732. 1    424092.
## 3 aparkinsoniana 3 99.9    46 99.4  7508. 0.634 239195.
## 4 aparkinsoniana 4 98.7    40 93.2  6800. 0.733 192704.
## 5 aparkinsoniana 5 190.    75 184. 25242. 0.547 1370647.
## # ... with 862 more rows
```

To apply *bio.volume* function uses the genus correspondent pco average or the default value (0.76) to calculate the individual biovolume when the provided dataset does not contain individual pco.

```
df2 <- bio.volume(ammonia, genus = "ammonia")
```

```
## Groups: <by row>
##
## # A tibble: 867 x 10
##   species      ind      h d_one d_two  area  pco model      vol biovol
##   <chr>      <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr> <dbl> <dbl>
## 1 aparkinsonia... 1 124.    52 121. 11280. 1    10h1 410853. 4.11e5
## 2 aparkinsonia... 2 113.    64 112.  9732. 1    10h1 424092. 4.24e5
## 3 aparkinsonia... 3 99.9    46 99.4  7508. 0.634 10h1 239195. 1.52e5
## 4 aparkinsonia... 4 98.7    40 93.2  6800. 0.733 10h1 192704. 1.41e5
## 5 aparkinsonia... 5 190.    75 184. 25242. 0.547 10h1 1370647. 7.50e5
## # ... with 862 more rows
```

Organic carbon biomass is finally individually calculated from informed biovolume and the chosen conversion factor as method argument.

```
biomass(df2, method = "michaels")
```

```
## # A tibble: 867 x 11
##   species      ind      h d_one d_two  area  pco model      vol biovol biomass
##   <chr>      <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <dbl> <chr> <dbl> <dbl> <dbl>
## 1 aparki... 1 124.    52 121. 11280. 1    10h1 4.11e5 4.11e5 0.0366
## 2 aparki... 2 113.    64 112.  9732. 1    10h1 4.24e5 4.24e5 0.0377
## 3 aparki... 3 99.9    46 99.4  7508. 0.634 10h1 2.39e5 1.52e5 0.0213
## 4 aparki... 4 98.7    40 93.2  6800. 0.733 10h1 1.93e5 1.41e5 0.0172
## 5 aparki... 5 190.    75 184. 25242. 0.547 10h1 1.37e6 7.50e5 0.122
## # ... with 862 more rows
```

The following steps must be considerate to use the package's full potential: Only images with a full black background should be considered

to ensure data processing quality. The photomicrographs must contain one specimen at time, as the insertion of more specimens per image might decrease the accuracy of measurements. In addition, the z-axis computed by Z-stack need to be specifically observed if there is more than one specimen photographed.

3.6 Conclusion

FORIMAGE R package is proposed as an alternative to manual and/or multi-software dependent methods for biometry and biomass estimation. Its applicability to marine ecology and micropaleontology studies is highlighted for an easy workflow with the steps necessary to standardize and minimize discrepancies within unicellular organism's biomass data acquisition. This package contains functions to extract measurements from microphotographs and their respective metadata files as well as to read the data directly from any data frame. It also provides functions that can be used alone or combined.

The example datasets, the help files and different methodological proposes inclusion along with R environment flexibility should allow both beginners and more advanced researches to easily implement the methods. This package was developed to support a wide range of studies, e.g., carbon fluxes modelling, quantify biologic productivity, biometric behaviour studies on micro and meiofaunal populations and several other applications. It is hoped that this tool will facilitate and encourage the acquisition and discussion of biomass data in a wider number of studies, making this variable an important (paleo)environmental proxy.

Acknowledgements

The biological material was prepared and processed by the Laboratory of Foraminiferal and Environmental Micropaleontology – UFPR. The data used within the package was made available by Petrobras monitoring program. Violeta I. Totah and Silvia Watanabe from the MACN (Buenos Aires) for species determination. Thanks to Davi Candido, Paulo França and Micael Broggio for pivotal Python support. Thanks to Marco Brustolin for statistical and research advice. Also, to Leonardo Sandrini and Kalina Brauko for the constructive critics that improved this work. And to the Coastal Oceanography Laboratory - UFSC for logistic support. This study was supported in part by INCT Mar-COI (400551/2014-4), by CAPES - Finance Code 001 and IODP CAPES (38/2014).

Availability

The package development source version is available in Github (<https://github.com/ThaiseRF/forImage>). It's distributed as open source under GPL ver. 3 license. The author can be contacted about eventual bugs and issues via (<https://github.com/ThaiseRF/forImage/issues>). FORMAGE depends on the following R packages: RETICULATE, XML2, DATA.TABLE, DPLYR, MAGRITTR and TIBBLE. All data used to create the datasets is available within */data-raw* folder in Github repository.

References

- Allaire, J., Ushey, K., 2018. R: reticulate. CRAN.
- Altenbach, A.V., 1987. The measurement of organic carbon in foraminifera. *J. Foraminifer. Res.* 17, 106–109. <https://doi.org/10.2113/gsjfr.17.2.106>
- Altenbach, A.V., Struck, U., 2001. On the coherence of organic carbon flux and benthic foraminiferal biomass. *J. Foraminifer. Res.* 31, 79–85. <https://doi.org/10.2113/0310079>
- Austen, M.C., Lamshead, P.J.D., Hutchings, P.A., Boucher, G., 2002. Biodiversity links above and below the marine sediment – water interface that may influence. *Biodivers. Conserv.* 11, 113–136.
- Biard, T., Stemmann, L., Picheral, M., Mayot, N., Vandromme, P., Hauss, H., Gorsky, G., Guidi, L., Kiko, R., Not, F., 2016. In situ imaging reveals the biomass of giant protists in the global ocean. *Nature* 532, 504–507. <https://doi.org/10.1038/nature17652>
- Bland, J.M., Altman, D.G., 1999. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 8, 135–160. <https://doi.org/10.1191/096228099673819272>
- Brouwer, M.G.M., Wolthers, M., Hazeleger, J.H., Rossi, F., Lourens, L.J., Middelburg, J.J., Duijnste, I.A.P., 2015. Differential Response of Intertidal Foraminifera To Community Recovery Following Experimentally Induced Hypoxia. *J. Foraminifer. Res.* 45, 220–234. <https://doi.org/10.2113/gsjfr.45.3.220>
- Butt, W.-R., Servin, M., Pause, M., 2017. Object Detection in Digital Images under Non-Standardized Conditions Using Illumination and Shadow Filtering. *Int. J. Comput. Inf. Eng.* 11, 1285–1293.
- Caron, D.A., 2016. Mixotrophy stirs up our understanding of marine food webs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 2806–2808. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600718113>
- DeLaca, T.E., 1986. Determination of benthic rhizopod biomass using ATP analysis. *J. Foraminifer. Res.* 16, 285–292.

- <https://doi.org/10.2113/gsjfr.16.4.285>
- Disaró, S.T., Aluizio, R., Ribas, E.R., Pupo, D.V., Tellez, I.R., Watanabe, S., Totah, V.I., Koutsoukos, E.A.M., 2017. Foraminíferos bentônicos na plataforma continental da Bacia de Campos, in: *Ambiente Bentônico*, Vol 3. Elsevier Ltd., pp. 65–110. <https://doi.org/10.1016/B978-85-352-7263-5.50004-7>
- Eliceiri, K.W., Berthold, M.R., Goldberg, I.G., Ibanez, L., Manjunath, B.S., Martone, M.E., Murphy, R.F., Peng, H., Plant, A.L., Roysam, B., Stuurman, N., Swedlow, J.R., Tomancak, P., Carpenter, A.E., 2012. Biological imaging software tools. *Nat Methods* 9, 697–710. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2084>
- Eppley, R.W., Chavez, F.P., Barber, R.T., 1992. Standing stocks of particulate carbon and nitrogen in the equatorial Pacific at 150°W. *J. Geophys. Res.* 97, 655. <https://doi.org/10.1029/91JC01386>
- Gambi, C., Corinaldesi, C., Dell’Anno, A., Pusceddu, A., D’Onghia, G., Covazzi-Harriague, A., Danovaro, R., 2017. Functional response to food limitation can reduce the impact of global change in the deep-sea benthos. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 26, 1008–1021. <https://doi.org/10.1111/geb.12608>
- Gerlach, S.A., Hahn, A., Schrage, M., 1985. Size spectra of benthic biomass and metabolism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 26, 161–173. <https://doi.org/10.3354/meps026161>
- Giavarina, D., 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem. Medica* 25, 141–151. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>
- Gifford, D.J., Caron, D.A., 2000. Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton. *ICES Zooplankt. Methodol. Man.* 193–221. <https://doi.org/10.1016/B978-012327645-2/50006-2>
- Griffiths, J.R., Kadin, M., Nascimento, F.J.A., 2017. The importance of benthic – pelagic coupling for marine ecosystem functioning in a changing world. *Glob. Chang. Biol.* 23, 2179–2196. <https://doi.org/10.1111/gcb.13642>
- Gutierrez-Rodriguez, A., Stukel, M.R., Lopes dos Santos, A., Biard, T., Scharek, R., Vaulot, D., Landry, M.R., Not, F., 2018. High contribution of Rhizaria (Radiolaria) to vertical export in the California Current Ecosystem revealed by DNA metabarcoding. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0322-7>
- Hannah, F., Rogerson, A., Laybourn-parry, J., 1994. Respiration Rates and Biovolumes of Common Benthic Foraminifera (Protozoa). *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 74, 301–312. <https://doi.org/10.1017/s0025315400039345>

- Hesse, T., Wolf-Gladrow, D., Lohmann, G., Bijma, J., Mackensen, A., Zeebe, R.E., 2014. Modelling $\delta^{13}\text{C}$ in benthic foraminifera: Insights from model sensitivity experiments. *Mar. Micropaleontol.* 112, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2014.08.001>
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35, 403–424. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>
- Hoffmann, R., Braeckman, U., Hasemann, C., Wenzhöfer, F., 2018. Deep-sea benthic communities and oxygen fluxes in the Arctic Fram Strait controlled by sea-ice cover and water depth. *Biogeosciences* 15, 4849–4869. <https://doi.org/10.5194/bg-15-4849-2018>
- Hudson, L.N., Blagoderov, V., Heaton, A., Holtzhausen, P., Livermore, L., Price, B.W., Walt, S. Van Der, Smith, V.S., 2015. Insect: Automating the Digitization of Natural History Collections. *PLoS One* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143402>
- Jauffrais, T., Jesus, B., Méléder, V., Geslin, E., 2017. Functional xanthophyll cycle and pigment content of a kleptoplastic benthic foraminifer: *Haynesina germanica*. *PLoS One* 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172678>
- Keating-Bitonti, C.R., Payne, J.L., 2018. Environmental influence on growth history in marine benthic foraminifera. *Paleobiology* 44, 736–757. <https://doi.org/10.1017/pab.2018.19>
- Kelly-Gerreyn, B.A., Martin, A.P., Bett, B.J., Anderson, T.R., Kaariainen, J.J., Main, C.E., Marcinko, C.J., Yool, A., 2014. Benthic biomass size spectra in shelf and deep-sea sediments. *Biogeosciences* 11, 6401–6416. <https://doi.org/10.5194/bg-11-6401-2014>
- Komosinski, M., Mensfelt, A., Tyszka, J., Goleń, J., 2017. Multi-agent simulation of benthic foraminifera response to annual variability of feeding fluxes. *J. Comput. Sci.* 21, 419–431. <https://doi.org/10.1016/j.jocs.2016.09.009>
- Lei, Y.-L., Stumm, K., Wickham, S.A., Berninger, U.-G., 2014. Distributions and Biomass of Benthic Ciliates, Foraminifera and Amoeboid Protists in Marine, Brackish, and Freshwater Sediments. *J. Eukaryot. Microbiol.* 61, 493–508. <https://doi.org/10.1111/jeu.12129>
- Ludbrook, J., 1997. Comparing methods of measurement: extensions. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 24, 193–203.
- Mazurkiewicz, M.M., Orska, B.G., Jankowska, E., Włodarska-

- Kowalczyk, M., Górska, B., Jankowska, E., Włodarska-Kowalczyk, M., 2016. Assessment of nematode biomass in marine sediments: A semi-automated image analysis method. *Limnol. Oceanogr. Methods*. <https://doi.org/10.1002/lom3.10128>
- Michaels, A.F., Caron, D.A., Swanberg, N.R., Howse, F.A., Michaels, C.M., 1995. Planktonic sarcodines (Acartaria, Radiolaria, Foraminifera) in surface waters near Bermuda: abundance, biomass and vertical flux. *J. Plankton Res.* 17, 131–163. <https://doi.org/10.1093/plankt/17.1.131>
- Movellan, A., Schiebel, R., Zubkov, M. V., Smyth, A., Howa, H., 2012. Protein biomass quantification of unbroken individual foraminifers using nano-spectrophotometry. *Biogeosciences* 9, 3613–3623. <https://doi.org/10.5194/bg-9-3613-2012>
- Nomaki, H., Heinz, P., Hemleben, C., Kitazato, H., 2005a. Behavior and response of deep-sea Benthic Foraminifera to freshly supplied organic matter: a laboratory feeding experiment in microcosm environments. *J. Foraminifer. Res.* 35, 103–113.
- Nomaki, H., Heinz, P., Nakatsuka, T., Shimanaga, M., Kitazato, H., 2005b. Species-specific ingestion of organic carbon by deep-sea benthic foraminifera at the sediment – water interface : In situ tracer experiments. *Limnol. Oceanogr.* 50, 2005–2005.
- Nomaki, H., Ogawa, N.O., Ohkouchi, N., Suga, H., Toyofuku, T., Shimanaga, M., Nakatsuka, T., Kitazato, H., 2008. Benthic foraminifera as trophic links between phytodetritus and benthic metazoans: Carbon and nitrogen isotopic evidence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 357, 153–164. <https://doi.org/10.3354/meps07309>
- Putt, M., Stoecker, D.K., 1989. An experimentally determined carbon : volume ratio for marine “oligotrichous” ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanogr.* 34, 1097–1103. <https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.6.1097>
- R Core Team, 2018. R Development Core Team. *R A Lang. Environ. Stat. Comput.*
- Raffaelli, D., Bell, E., Weithoff, G., Matsumoto, A., Cruz-motta, J.J., Kershaw, P., Parker, R., Parry, D., Jones, M., 2003. The ups and downs of benthic ecology : considerations of scale , heterogeneity and surveillance for benthic – pelagic coupling. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 285–286, 191–203. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(02\)00527-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(02)00527-0)
- Rowe, G.T., Wei, C., Nunnally, C., Haedrich, R., Montagna, P., Baguley, J.G., Bernhard, J.M., Wicksten, M., Ammons, A., Briones, E.E., Soliman, Y., Deming, J.W., 2008. Comparative biomass structure

- and estimated carbon flow in food webs in the deep Gulf of Mexico. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 55, 2699–2711. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.07.020>
- Sai Elangovan, S., Padmavati, G., 2017. Distribution, diversity and carbon content of the tintinnids from the coastal waters of Port Blair, South Andaman. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 14, 132–144. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2017.06.001>
- Saidova, K., 1966. The biomass and quantitative distribution of live foraminifera in the Kurile-Kamchatka trench area. *Dokl. AKAD. Nauk SSSR* 174, 216–217.
- Shapiro, L., Stockman, G., 2000. *Computer Vision*. Prentice Hall, New York. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05606-7_5
- Soltwedel, T., 2000. Metazoan meiobenthos along continental margins: A review. *Prog. Oceanogr.* 46, 59–84. [https://doi.org/10.1016/S0079-6611\(00\)00030-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6611(00)00030-6)
- Stoecker, D.K., Johnson, M.D., De Vargas, C., Not, F., 2009. Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquat. Microb. Ecol.* 57, 279–310. <https://doi.org/10.3354/ame01340>
- Strathmann, R., 1967. Estimating the Organic Carbon Content of Phytoplankton from Cell Volume or Plasma Volume. *Limnol. Oceanogr.* 12, 411–418. <https://doi.org/10.4319/lo.1967.12.3.0411>
- Stukel, M.R., Biard, T., Krause, J., Ohman, M.D., 2018. Large Phaeodaria in the twilight zone: Their role in the carbon cycle. *Limnol. Oceanogr.* 63, 2579–2594. <https://doi.org/10.1002/lno.10961>
- Sun, J., Liu, D., 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.* 25, 1331–1346. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>
- Turley, C., Newell, R., Robins, D., 1986. Survival strategies of two small marine ciliates and their role in regulating bacterial community structure under experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33, 59–70. <https://doi.org/10.3354/meps033059>
- Vadrucci, M.R., Cabrini, M., Basset, A., 2007. Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transitional Waters Bull.* 2, 83–102. <https://doi.org/10.1285/i1825229Xv1n2p83>
- Vasselon, V., Bouchez, A., Rimet, F., Jacquet, S., Trobajo, R., Corniquel, M., Tapolczai, K., Domaizon, I., 2018. Avoiding quantification bias in metabarcoding: Application of a cell biovolume correction factor in diatom molecular biomonitoring. *Methods Ecol. Evol.* 9, 1060–1069. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12960>
- Wassmann, P., Ypma, J.E., Tselepidis, A., 2000. Vertical flux of faecal

- pellets and microplankton on the shelf of the oligotrophic Cretan Sea (NE Mediterranean Sea). *Prog. Oceanogr.* 46, 241–258. [https://doi.org/10.1016/S0079-6611\(00\)00021-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6611(00)00021-5)
- Wei, C.-L., Rowe, G.T., Escobar-Briones, E., Boetius, A., Soltwedel, T., Caley, M.J., Soliman, Y., Huettmann, F., Qu, F., Yu, Z., Pitcher, C.R., Haedrich, R.L., Wicksten, M.K., Rex, M.A., Baguley, J.G., Sharma, J., Danovaro, R., MacDonald, I.R., Nunnally, C.C., Deming, J.W., Montagna, P., Lévesque, M., Weslawski, J.M., Wlodarska-Kowalczyk, M., Ingole, B.S., Bett, B.J., Billett, D.S.M., Yool, A., Bluhm, B.A., Iken, K., Narayanaswamy, B.E., 2010. Global Patterns and Predictions of Seafloor Biomass Using Random Forests. *PLoS One* 5, e15323. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015323>
- Worden, A.Z., Follows, M.J., Giovannoni, S.J., Wilken, S., Zimmerman, A.E., Keeling, P.J., 2015. Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* (80-.). 347. <https://doi.org/10.1126/science.1257594>
- Wukovits, J., Bukenberg, P., Enge, A.J., Gerg, M., Wanek, W., Watzka, M., Heinz, P., 2018. Food supply and size class depending variations in phytodetritus intake in the benthic foraminifer *Ammonia tepida*. *Biol. Open* 7, bio030056. <https://doi.org/10.1242/bio.030056>
- Yool, A., Martin, A.P., Anderson, T.R., Bett, B.J., Jones, D.O.B., Ruhl, H.A., 2017. Big in the benthos: Future change of seafloor community biomass in a global, body size-resolved model. *Glob. Chang. Biol.* 23, 3554–3566. <https://doi.org/10.1111/gcb.13680>

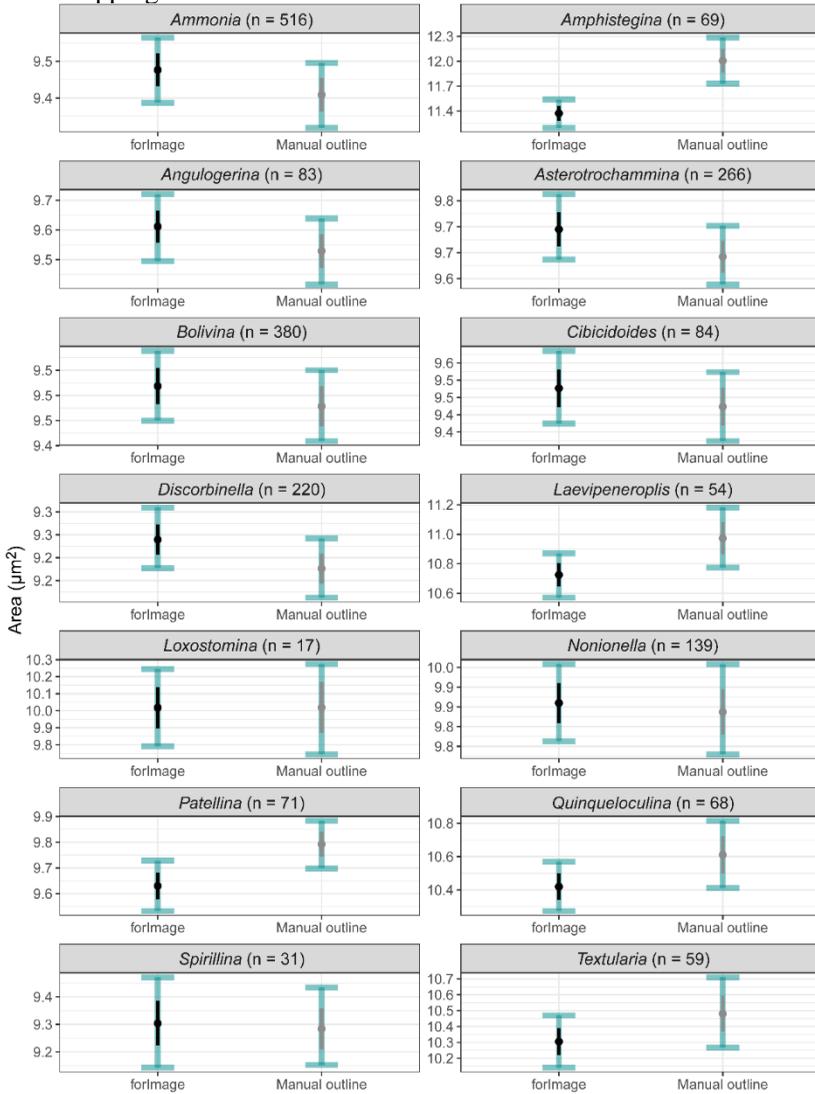
Table S1 Dataset (`data_pco`) available within forImage package. Foraminifera genera percent (mean \pm SD) of cell occupancy (PCO) of the test and its correspondent geometric model.

Genera	n	PCO (mean)	PCO (sd)	model
<i>Ammonia</i>	867	78.53	25.24	10hl
<i>Amphistegina</i>	167	63.92	32.98	5hl
<i>Angulogerina</i>	95	70.57	31.12	12v
<i>Archaias</i>	24	77.42	30.80	3hl
<i>Articulina</i>	5	43.41	11.21	14hl
<i>Asterotrochammina</i>	335	84.40	24.82	6fs
<i>Astrononion</i>	10	75.06	25.39	10hl
<i>Bolivina</i>	628	71.60	24.98	13hls
<i>Buliminella</i>	111	88.98	19.14	10hl
<i>Cancris</i>	4	100.00	0.00	10hl
<i>Caronia</i>	41	76.68	29.23	11fs
<i>Cassidulina</i>	2	64.79	9.02	10hl
<i>Cibicides</i>	37	56.41	26.17	2sl
<i>Cibicoides</i>	118	75.26	27.42	2sl
<i>Cornuspira</i>	18	71.87	35.21	8hl
<i>Criboelphidium</i>	20	73.31	33.02	3hl
<i>Cymbaloporetta</i>	201	55.45	35.74	7fs
<i>Deuterammina</i>	93	88.73	20.62	6fs
<i>Disconorbis</i>	5	40.64	34.89	7fs
<i>Discorbia</i>	14	43.16	21.52	7fs
<i>Discorbinella</i>	318	70.10	27.42	7fs
<i>Discorbis</i>	131	66.24	29.49	7fs
<i>Discorbitina</i>	46	92.81	16.95	7fs
<i>Edentostomina</i>	41	92.46	15.40	10hl
<i>Elphidium</i>	22	52.85	29.03	3hl
<i>Eoeponidella</i>	30	79.95	25.58	7fs
<i>Eponides</i>	16	65.43	24.25	10hl
<i>Fissurina</i>	5	15.55	8.07	10hl
<i>Fursenkoina</i>	7	86.90	20.18	10hl

<i>Glabratella</i>	30	81.53	26.92	7fs
<i>Globocassidulina</i>	32	83.89	26.05	10hl
<i>Hanzawaia</i>	4	67.33	37.93	7fs
<i>Hauerina</i>	34	88.95	19.29	10hl
<i>Heronallenia</i>	6	86.44	15.57	7fs
<i>Heterostegina</i>	3	56.47	38.94	3hl
<i>Laevipeneroplis</i>	79	74.40	29.25	3hl
<i>Lepidodeuterammina</i>	13	97.45	9.19	6fs
<i>Loxostomina</i>	30	56.90	27.90	14hl
<i>Miliolinella</i>	32	75.76	27.56	10hl
<i>Mullinoides</i>	48	78.46	25.19	7fs
<i>Mychostomina</i>	159	94.02	16.74	7fs
<i>Neoconorbina</i>	307	75.52	27.44	7fs
<i>Nonionella</i>	208	89.08	18.17	15hl
<i>Nonioninoides</i>	89	76.26	26.28	15hl
<i>Pararotalia</i>	267	59.73	25.10	10hl
<i>Paratrochammina</i>	45	90.37	19.65	6fs
<i>Patellina</i>	77	89.98	22.48	4hl
<i>Planispirillina</i>	57	90.52	18.32	8hl
<i>Planorbulina</i>	23	62.50	30.53	7fs
<i>Planulina</i>	8	93.53	18.31	7fs
<i>Pyrgo</i>	68	74.62	32.27	1hl
<i>Quinqueloculina</i>	688	82.01	24.85	17fs
<i>Rectocibicides</i>	199	69.15	28.13	axh
<i>Remaneicella</i>	43	93.81	16.42	6fs
<i>Reophax</i>	4	67.08	38.12	11fs
<i>Rosalina</i>	258	86.05	23.31	10hl
<i>Rotaliammina</i>	495	93.35	15.70	6fs
<i>Rotorbinella</i>	214	75.51	25.48	7fs
<i>Rotorbis</i>	12	49.38	32.11	4hl
<i>Sahulia</i>	14	73.16	33.55	11fs
<i>Sigmavirgulina</i>	116	75.76	27.74	13hlsI
<i>Siphonina</i>	2	60.70	55.57	3hl

<i>Sorites</i>	7	50.42	37.30	axh
<i>Spirillina</i>	41	90.13	21.30	8hl
<i>Spiroloculina</i>	4	88.73	22.53	10hl
<i>Spirorbina</i>	12	58.14	29.01	7fs
<i>Tetrataxiella</i>	4	82.50	35.00	11fs
<i>Textularia</i>	84	84.59	24.49	11fs
<i>Triloculina</i>	177	83.87	24.09	17fs
<i>Triloculinella</i>	16	77.41	24.44	3hl
<i>Trochammina</i>	2	64.56	12.24	7fs
<i>Webbinella</i>	13	90.00	19.64	axh
<i>Wiesnerella</i>	143	77.80	26.58	axh

Figure S1 Foraminiferal surface area (mean \pm SE) of estimated using different methods. Light blue interval bars indicate 95% CI estimated by bootstrapping.



4 CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho partiu da relação entre a morfologia das carapaças de foraminíferos e figuras geométricas e incluiu o percentual médio de ocupação celular por gênero para propor uma rotina automatizada de estimativa da biomassa com base no biovolume. A pesquisa consistiu em sistematizar o conhecimento existente para estimativa de biomassa pelo método do biovolume e aplicá-lo no desenvolvimento de um pacote de código aberto e gratuito, desenvolvido em linguagem R. As funções automatizam o reconhecimento do contorno das carapaças em fotomicrografias e permitem mensurar as dimensões dos eixos da carapaça. Elas também permitem a importação de conjuntos de dados adquiridos previamente, e convertem as medidas volumétricas em biovolume com base no percentual médio de ocupação protoplasmática das testas. A partir destes dados estimam a biomassa de carbono individual ($\mu\text{gC}_{\text{org. ind}}^{-1}$) a partir de diferentes fatores de conversão de carbono:volume como medidas de densidade celular.

Análises comparativas entre os resultados obtidos a partir do uso do sistema automatizado (pacote FORIMAGE) de medição de área superficial e, aqueles determinados à partir da tomada manual do contorno das testas por um pesquisador, levaram a valores estatisticamente semelhantes na maioria dos táxons analisados.

Conclui-se assim que a rotina proposta se apresenta como uma alternativa que: (1) reduz a subjetividade na obtenção das métricas, permitindo a comparação de resultados entre diferentes grupos de pesquisa; (2) otimiza o tempo de aquisição de dados, facilitando a aquisição de maior quantidade de dados; (3) sintetiza e hierarquiza as etapas metodológicas envolvidas na determinação de biomassa, facilitando seu emprego mesmo por pesquisadores menos experientes nestes procedimentos. Apesar do pacote necessitar de um conhecimento básico do ambiente R para a sua aplicação, esse trabalho se apresenta como um guia de aplicação do pacote, e conta com exemplos e dados para teste e replicação do estudo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Testes de aplicação realizados após o desenvolvimento do pacote indicam que para obter resultados satisfatórios, as imagens precisam ser cuidadosamente fotografadas, com o fundo limpo, um range de foco preciso e iluminação uniforme. A revisão das imagens salvas pelo pacote é necessária para avaliar se o contorno obtido reflete o contorno real do indivíduo. Mais de um indivíduo pode ser mensurado na mesma fotomicrografia, no entanto, é recomendado a medição de um indivíduo por fotomicrografia (microscopia ótica) para evitar erros.

Os percentuais de ocupação (pco) pré-determinados por gênero devem ser utilizados, preferencialmente, ao invés de um percentual fixo para toda a assembleia. A utilização de fatores de conversão deve ser utilizada com cuidado. Como o uso de fator de conversão inadequado de biovolume em biomassa continua sendo uma fonte de erro, novas determinações da relação C: V para foraminíferos bentônicos são necessárias.

Versões futuras do pacote devem ser implementadas com o tempo que além de correções de erros e *bugs* devem considerar a criação de um banco de dados de tamanho e biomassa. Essas atualizações contam com a utilização do pacote por usuários. E da aplicação aos diferentes grupos de microfósseis e outros organismos unicelulares, para ampliar a utilização do pacote que tende a crescer com as necessidades futuras e entrada do usuário.

REFERÊNCIAS

ALTENBACH, A. V. **Die Biomasse der benthischen Foraminiferen.** [s.l.] Kiel University, 1985.

ALTENBACH, A. V. The measurement of organic carbon in foraminifera. **Journal of Foraminiferal Research**, v. 17, n. 2, p. 106–109, 1987.

ALTENBACH, A. V. et al. Scaling percentages and distributional patterns of benthic foraminifera with flux rates of organic carbon. **Journal of Foraminiferal Research**, v. 29, n. 3, p. 173–185, 1999.

ALTENBACH, A. V.; SARNTHEIN, M. Productivity record in benthic foraminifera. **Productivity of the ocean: present and past, Dahlem Konferenzen, Chichester**, n. January 1989, p. 255–269, 1989.

ALTENBACH, A. V.; STRUCK, U. On the coherence of organic carbon flux and benthic foraminiferal biomass. **The Journal of Foraminiferal Research**, v. 31, n. 2, p. 79–85, 2001.

ÁLVAREZ, E.; LÓPEZ-URRUTIA, Á.; NOGUEIRA, E. Improvement of plankton biovolume estimates derived from image-based automatic sampling devices: Application to FlowCAM. **Journal of Plankton Research**, v. 34, n. 6, p. 454–469, 2012.

ALVE, E. Benthic foraminiferal responses to estuarine pollution; a review. **The Journal of Foraminiferal Research**, v. 25, n. 3, p. 190–203, 1995.

BOLTOVSKOY, E. Foraminifera as biological indicators in the study of ocean currents. **Micropaleontology**, v. 5, n. 4, p. 473–481, 1959.

BROUWER, G. M. et al. Diet shifts and population dynamics of estuarine foraminifera during ecosystem recovery after experimentally induced hypoxia crises. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 170, p. 20–33, 2016.

CARPENTER, A. E.; KAMENSKY, L.; ELICEIRI, K. W. A Call for Bioimaging Software Usability. **Biophysical Chemistry**, v. 257, n. 5, p. 2432–2437, 2013.

CESBRON, F. et al. Vertical distribution and respiration rates of benthic foraminifera: Contribution to aerobic remineralization in intertidal mudflats covered by *Zostera noltei* meadows. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 179, n. February, p. 23–38, 2016.

CORLISS, B. H. Microhabitats of benthic foraminifera within deep-sea sediments. **Nature**, v. 314, n. 6, p. 435–438, 1985.

CORLISS, B. H.; CHEN, C. Morphotype patterns of Norwegian Sea deep-sea benthic foraminifera and ecological implications. **Geology**, v. 16, n. 8, p. 716, 1988.

CULVER, S. J.; LIPPS, J. H. Predation on and by Foraminifera. In: **Predator-Prey Interactions in the Fossil Record.** [s.l.: s.n.]. p. 7–32.

DA SILVA, R. A. M. **Proposta metodológica para a estimativa da biomassa de buliminella elegantissima (Foraminifera) utilizando técnicas de microscopia confocal e processamento digital de imagens.** [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Oceanografia), Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

DE RIJK, S. et al. Organic flux control on bathymetric zonation of Mediterranean benthic foraminifera. **Marine Micropaleontology**, v. 40, n. 3, p. 151–166, 2000.

DEBENAY, J. P. et al. Water stratification in coastal lagoons: Its influence on foraminiferal assemblages in two Brazilian lagoons. **Marine Micropaleontology**, v. 35, n. 1–2, p. 67–89, 1998.

DELACA, T. E. Determination of benthic rhizopod biomass using ATP analysis. **The Journal of Foraminiferal Research**, v. 16, n. 4, p. 285–292, 1986.

DIJKSTRA, N. et al. Benthic foraminifera as bio-indicators of chemical and physical stressors in Hammerfest harbor (Northern Norway). **Marine Pollution Bulletin**, v. 114, n. 1, p. 384–396, 2017.

DISARÓ, S. T. et al. Foraminíferos bentônicos na plataforma continental da Bacia de Campos. In: **Ambiente Bentônico, Vol 3.** [s.l.] Elsevier Ltd., 2017. p. 65–110.

FREITAS, T. R. DE. **AVALIAÇÃO DO BIOVOLUME COMO MÉTODO DE ESTIMATIVA DE BIOMASSA DE FORAMINÍFEROS BENTÔNICOS.** [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Oceanografia), Universidade Federal do Paraná, 2016.

FREITAS, T. R. DE; BACALHAU, E. T.; DISARÓ, S. T. **Revisiting biovolume method for foraminiferal biomass assessment: incorporating geometric models and interspecific protoplasm occupancy.** [s.l.] Article in preparation, 2019.

FRONTALINI, F. et al. On the quantitative distribution and community structure of the meio and macrofaunal communities in the coastal area of the Central Adriatic Sea (Italy). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 180, n. 1–4, p. 325–344, 2011.

FRONTALINI, F.; COCCIONI, R. Benthic foraminifera as bioindicators of pollution: A review of Italian research over the last three decades. **Revue de Micropaleontologie**, v. 54, n. 2, p. 115–127, 2011.

GERLACH, S. A.; HAHN, A.; SCHRAGE, M. Size spectra of benthic biomass and metabolism . **Marine Ecology Progress Series**, v. 26, p. 161–173, 1985.

GESLIN, E. et al. Oxygen respiration rates of benthic foraminifera as measured with oxygen microsensors. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 396, n. 2, p. 108–114, 2011.

GOLDBECK, E. J.; HOUBEN, C.; LANGER, M. R. Survival of foraminifera in the gut of holothuroids from Elba Island (Mediterranean Sea).

Revue de Micropaleontologie, v. 48, n. 3, p. 169–174, 2005.

GOODAY, A. J. et al. The Role Of Benthic Foraminifera in Deep-Sea Food Webs and Carbon Cycling. **Deep-Sea Food Chains and the Global Carbon Cycle**, v. 360, p. 63–91, 1992.

GOODAY, A. J.; JORISSEN, F. J. Benthic foraminiferal biogeography: controls on global distribution patterns in deep-water settings. **Annual review of marine science**, v. 4, p. 237–62, 2012.

GORSKY, G. et al. Digital zooplankton image analysis using the ZooScan integrated system. **Journal of Plankton Research**, v. 32, n. 3, p. 285–303, 2010.

GUDMUNDSSON, G. et al. Diets of four deep-water scaphopod species (Mollusca) in the North Atlantic and the Nordic Seas. **Marine Biology**, v. 142, n. 6, p. 1103–1112, 2003.

HANNAH, F.; ROGERSON, A.; LAYBOURN-PARRY, J. Respiration Rates and Biovolumes of Common Benthic Foraminifera (Protozoa). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 74, p. 301–312, 1994.

HAYWARD, B. W.; GRENFELL, H. R.; SCOTT, D. B. Tidal range of marsh foraminifera for determining former sea-level heights in New Zealand. **New Zealand Journal of Geology and Geophysics**, v. 42, n. 9, p. 395–413, 1999.

HEALY-WILLIAMNS, N.; WILLIAMS, D. F. Fourier analysis of test shape of planktonic foraminifera. **Nature**, v. 289, n. 5, p. 485–487, 1981.

HOTTINGER, L. Functional morphology of benthic foraminiferal shells, envelopes of cells beyond measure. **Micropaleontology**, v. 46, n. 2000, p. 57–86, 2000.

HOTTINGER, L. Illustrated glossary of terms used in foraminiferal research. **Carnets de géologie (Notebooks on geology)**, v. 02, n. Mémoires, p. 44–64, 2006.

JAUFFRAIS, T. et al. Functional xanthophyll cycle and pigment content of a kleptoplastic benthic foraminifer : *Haynesina germanica*. **PLoS ONE**, p. 1–15, 2017.

JEFFREYS, R. M. et al. The trophic and metabolic pathways of foraminifera in the Arabian Sea: Evidence from cellular stable isotopes. **Biogeosciences**, v. 12, n. 6, p. 1781–1797, 2015.

JONES, R. W. **Foraminifera and their Applications**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. v. 30

JORISSEN, F. J. Benthic foraminiferal microhabitats below the sediment-water interface. In: SEN GUPTA, B. K. (Ed.). **Modern foraminifera**. [s.l.] Springer Netherlands, 1999. p. 161–179.

KEATING-BITONTI, C. R.; PAYNE, J. L. Physicochemical controls on biogeographic variation of benthic foraminiferal test size and shape. **Paleobiology**, v. 42, n. 4, p. 595–611, 2016.

KEATING-BITONTI, C. R.; PAYNE, J. L. Ecophenotypic responses of benthic foraminifera to oxygen availability along an oxygen gradient in the California Borderland. **Marine Ecology**, v. 38, n. 3, p. e12430, 2017.

KELLY-GERREYN, B. A. et al. Benthic biomass size spectra in shelf and deep-sea sediments. **Biogeosciences**, v. 11, n. 22, p. 6401–6416, 2014.

KORSUN, S. et al. Biomass of foraminifera in the St. Anna Trough, Russian arctic continental margin. **Sarsia**, v. 83, n. 5, p. 419–431, 30 nov. 1998.

KORSUN, S. Allogromiids in foraminiferal assemblages on the western eurasian arctic shelf. **The Journal of Foraminiferal Research**, v. 32, n. 4, p. 400–413, 1 out. 2002.

LANGER, M. R.; LIPPS, J. H.; MORENO, G. Predation on foraminifera. **Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers**, v. 42, n. 6, p. 849–857, 1995.

LEI, Y.-L. et al. Distributions and Biomass of Benthic Ciliates, Foraminifera and Amoeboid Protists in Marine, Brackish, and Freshwater Sediments. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 493–508, set. 2014.

LUIZ, L. et al. Foraminíferos e atividade bacteriana aplicados no diagnóstico ambiental do estuário do rio Itacorubí, Florianópolis, SC. **Revista Brasileira de Geociências**, v. 37, n. 3, p. 565–578, 2007.

MALERBA, M. E.; PALACIOS, M. M.; MARSHALL, D. J. Do larger individuals cope with resource fluctuations better? An artificial selection approach. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1884, 2018.

MALERBA, M. E.; WHITE, C. R.; MARSHALL, D. J. Eco-energetic consequences of evolutionary shifts in body size. **Ecology Letters**, v. 21, n. 1, p. 54–62, 2018.

MARTINS, M. V. A. et al. Response of Benthic Foraminifera to Environmental Variability: Importance of Benthic Foraminifera in Monitoring Studies. In: **Monitoring of Marine Pollution [Working Title]**. [s.l.] IntechOpen, 2019. p. 1–26.

MOJTAHID, M.; JORISSEN, F.; PEARSON, T. H. Comparison of benthic foraminiferal and macrofaunal responses to organic pollution in the Firth of Clyde (Scotland). **Marine Pollution Bulletin**, v. 56, n. 1, p. 42–76, 2008.

MOVELLAN, A. et al. Protein biomass quantification of unbroken individual foraminifera using nano-spectrophotometry. **Biogeosciences**, v. 9, n. 9, p. 3613–3623, 2012.

MURRAY, J. W. Living foraminifera of lagoons and estuaries. **Micropaleontology**, v. 14, n. 4, p. 435–455, 1968.

MURRAY, J. W. **Distribution and Ecology of Living Benthic Foraminiferids**. [s.l.] Crane, Russak & Company, Inc., 1973.

MURRAY, J. W. **Ecology and Applications of Benthic Foraminifera**. [s.l.] Cambridge University Press, 2006.

MURRAY, J. W. W.; ALVE, E. Major aspects of foraminiferal variability (standing crop and biomass) on a monthly scale in an intertidal zone. **Journal of Foraminiferal Research**, v. 30, n. 3, p. 177–191, 2000.

NIKOLAEV, S. I. et al. The twilight of Heliozoa and rise of Rhizaria, an emerging supergroup of amoeboid eukaryotes. **PNAS**, v. 101, n. 21, p. 8066–8071, 2004.

NOMAKI, H. et al. Species-specific ingestion of organic carbon by deep-sea benthic foraminifera at the sediment – water interface : In situ tracer experiments. **Limnology and Oceanography**, v. 50, n. 1, p. 2005–2005, 2005.

NOMAKI, H. et al. Benthic foraminifera as trophic links between phytodetritus and benthic metazoans: Carbon and nitrogen isotopic evidence. **Marine Ecology Progress Series**, v. 357, p. 153–164, 2008.

PARKER, J. Ultrastructure of the test wall in modern porcelaneous Foraminifera: implications for the classification of the Miliolida. **Journal of Foraminiferal Research**, v. 47, n. 2, p. 136–174, 2017.

PIOT, A.; NOZAIS, C.; ARCHAMBAULT, P. Meiofauna affect the macrobenthic biodiversity-ecosystem functioning relationship. **Oikos**, v. 123, n. 2, p. 203–213, 2014.

ROWE, G. T. et al. Comparative biomass structure and estimated carbon flow in food webs in the deep Gulf of Mexico. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 55, n. 24–26, p. 2699–2711, dez. 2008.

SACCÀ, A. Methods for the estimation of the biovolume of microorganisms: A critical review. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 15, n. 4, p. 337–348, 2017.

SAIDOVA, K. The biomass and quantitative distribution of live foraminifera in the Kurile-Kamchatka trench area. **DOKLADY AKADEMII NAUK SSSR**, v. 174, n. 1, p. 216–217, 1966.

SCHÖNFELD, J. et al. The FOBIMO (FORaminiferal BIOMonitoring) initiative-Towards a standardised protocol for soft-bottom benthic foraminiferal monitoring studies. **Marine Micropaleontology**, v. 94–95, p. 1–13, 2012.

SZAREK, R. et al. Distribution of recent benthic foraminifera on the Sunda Shelf (South China Sea). **Marine Micropaleontology**, v. 61, n. 4, p. 171–195, 2006.

THOMSEN, L.; ALTENBACH, A. V. Vertical and areal distribution of foraminiferal abundance and biomass in microhabitats around inhabited tubes of marine echinurids. **Marine Micropaleontology**, v. 20, n. 3–4, p. 303–309, 1993.

WEI, C.-L. et al. Global Patterns and Predictions of Seafloor Biomass

Using Random Forests. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15323, 2010.

WIDBOM, B. Determination of average individual dry weights and ash-free dry weights in different sieve fractions of marine meiofauna. **Marine Biology**, v. 84, n. 1, p. 101–108, 1984.

WUKOVITS, J. et al. The distinct roles of two intertidal foraminiferal species in phytodetrital carbon and nitrogen fluxes -results from laboratory feeding experiments. **Biogeosciences**, v. 15, n. 20, p. 6185–6198, 2018.

YOOL, A. et al. Big in the benthos: Future change of seafloor community biomass in a global, body size-resolved model. **Global Change Biology**, v. 23, n. 9, p. 3554–3566, 2017.