

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

RELATÓRIO ANUAL 2

METODOLOGIA

Anexo 7 – Ictiofauna e Carcinofauna marinha

Câmara Técnica

Adalto Bianchini

Alex Cardoso Bastos

Edmilson Costa Teixeira

Eustáquio Vinícius de Castro

Fabian Sá

Jorge Abdala Dergam dos Santos

1 ÁREA DE ESTUDO DO ANEXO 7 – ICTIOFAUNA E CARCINOFAUNA ESTUARINA/MARINHA E ICTIOFAUNA RECIFAL

Com o objetivo de monitorar diversos aspectos ecológicos da ictiofauna estuarina/marinha e recifal, e da carcinofauna estuarina/marinha após o Rompimento da Barragem de Fundão (Mariana/MG), pontos de amostragem foram distribuídos ao longo da costa. Os pontos foram distribuídos entre o sul da Bahia (Caravelas), incluindo Abrolhos, e a região centro-norte do Espírito Santo (até Aracruz). Esta amostragem visou abranger a área atingida diretamente pela lama de rejeito de minério de ferro (baixo Rio Doce, distante cerca de 3 km da foz, e área marinha adjacente) e também áreas consideradas referência, que sofreram menor impacto do rejeito.

Além do Rio Doce (município de Linhares/ES, distrito de Regência) e área marinha adjacente, ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas foram estudadas nos estuários dos rios Caravelas (Caravelas/BA), São Mateus (Conceição da Barra/ES), Ipiranga (São Mateus/ES, distrito de Urussuquara) e Piraquê-Açu (Aracruz/ES, distrito de Santa Cruz). Visando descrever o recrutamento larval de peixes estuarinos foram utilizadas as mesmas regiões amostradas para a ictiofauna e carcinofauna de substratos inconsolidados, com exceção dos rios Ipiranga e Caravelas que foram substituídos pelo rio Piraquê-Açu e rio Mucuri, respectivamente, devido à profundidade de operação das armadilhas luminosas (ver Protocolo Recrutamento pós-larvas), sendo ao total quatro estuários denominados como segue: Local Impacto=Rio Doce, Locais controles C1=rio Piraquê-Açu, C2=rio São Mateus e C3=rio Mucuri. Em contrapartida, as amostragens do monitoramento referentes ao recrutamento larval de peixes recifais foram realizadas de forma concomitante com as saídas de censo visuais em quatro localidades: CA-Recifes de Coroa Vermelha e Nova Viçosa denominado como “Cassurubá”; PP-Parcel das Paredes; ABR-Arquipélago dos Abrolhos e PAB-Parcel dos Abrolhos (Protocolo Recrutamento pós-larvas). Ainda que sejam os mesmos pontos das campanhas do censo visual, optou-se por usar nomenclatura diferente para distinguir os planos de amostragem.

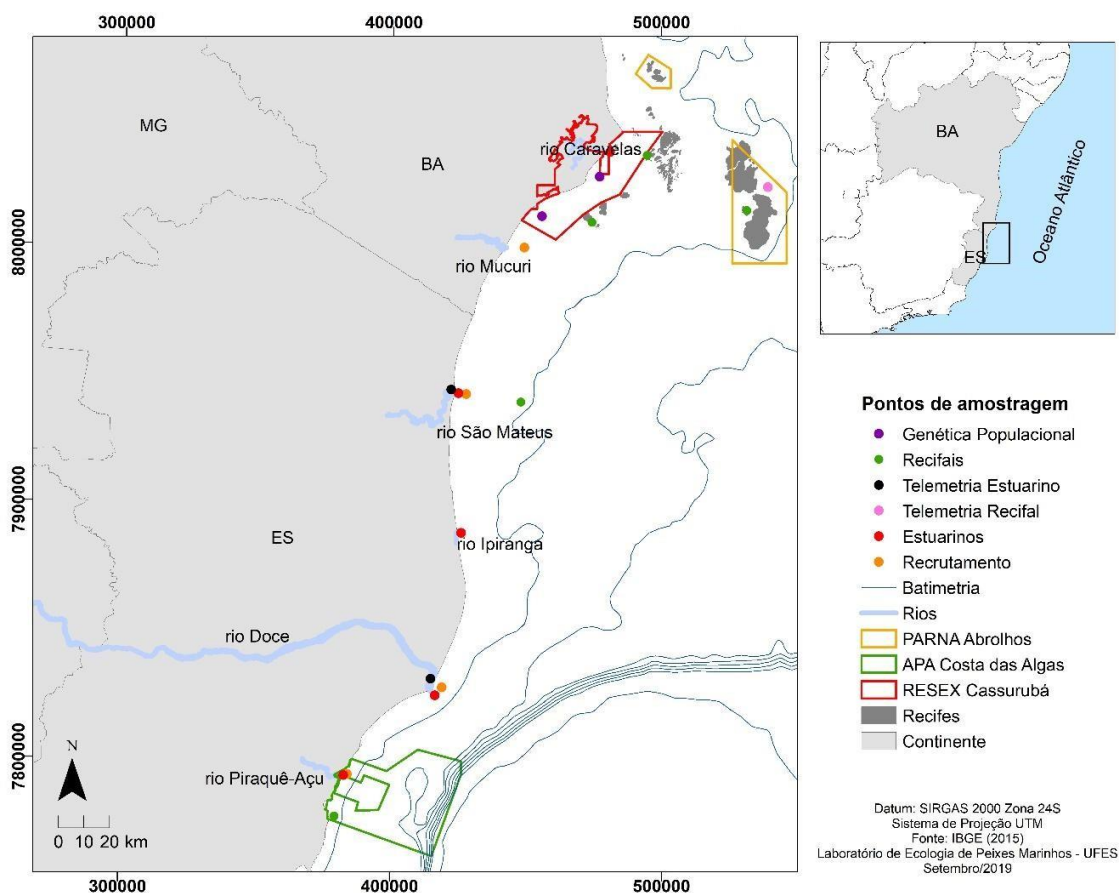
O estudo de telemetria de peixes estuarinos/marinhos foi desenvolvido nos estuários dos Rios Doce e São Mateus e áreas marinhas adjacentes. Para as análises de microquímica de otólitos, os exemplares de peixes são provenientes tanto das coletas utilizadas para os estudos da ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas, quanto de aquisição em peixarias de quatro estuários amostrados: Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Doce.

Os estudos de genética de populações foram realizados coletando-se amostras de peixes recifais e estuarinos. Para os peixes estuarinos as amostras foram coletadas concomitantemente com as campanhas dos estudos de ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas, nos rios: rio Caravelas (CA), Rio Doce (DO), rio Ipiranga (IP) e São Mateus (SM). Para os peixes recifais foram delimitadas quatro áreas ao longo da área de abrangência do PMBA/Fest-RRDM, sendo: A1 -Norte de Abrolhos e Royal Charlotte, A2 - Sul do banco de Abrolhos, A3 - Plataforma estreita entre Linhares e Piúma, A4 - Marataízes e norte do RJ (ver Protocolo Genética de Populações).

Visando os estudos de censo visual (ver Protocolo Censo Visual), as localidades foram amostradas e classificadas segundo a sua distância da foz do Rio Doce utilizando um desenho de impacto de impacto *beyond-BACI* (*Before After Control Impact*) proposto por Underwood (1992). A área de estudo contém cinco localidades: impacto - APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz (denominada daqui em diante de “APA Costa das Algas” e referida nas figuras como “I”), o Controle I – denominado Recifes Esquecidos (e indicado nas figuras como “C1”), Controle II – Recifes da RESEX Cassurubá (Recifes de Sebastião Gomes, Coroa Vermelha e Nova Viçosa); (denominado daqui em diante como “Cassurubá” e referida nas figuras como “C2”), Controle III – Parcel das Paredes (denominado como “Paredes” e indicado nas figuras como “C3”) e o Controle IV – PARNA Abrolhos (denominado “Abrolhos” e indicado nas figuras como “C4”). Já o estudo de telemetria de peixes recifais, a área de amostragem e monitoramento se restringe ao Parque Nacional Marinho dos Abrolhos.

Os pontos amostrados em todos os subprojetos do Anexo 7, entre outubro/2018 e fevereiro/2020, encontram-se na Figura 1 e mais detalhes podem ser encontrados nas seções de cada subprojeto.

Figura 1: Mapa da área de estudo exibindo os locais amostrados durante os estudos da ictiofauna estuarina/marinha e recifal, além da carcinofauna estuarina/marinha, nas áreas direta e indiretamente impactadas pela lama de rejeitos de minério provenientes do Rompimento da Barragem de Fundão (Mariana/MG). Diversos aspectos ecológicos das comunidades e populações dos peixes e crustáceos foram estudados entre outubro/2018 e fevereiro/2020



2 ICTIOFAUNA E CARCINOFAUNA ESTUARINA/MARINHA

2.1 ÁREA DE ESTUDO

Para a descrição da ictiofauna e carcinofauna estuarina/marinha de substrato inconsolidado, foram realizadas amostragens mensais (ano 1 - entre outubro/2018 e setembro/2019), que passaram a ser trimestrais (transição – novembro e dezembro/2019 e fevereiro/2020) na porção do baixo Rio Doce e sua área marinha adjacente (local do impacto). Além disso, representando um gradiente de impacto, foram também amostradas os estuários e áreas adjacentes aos rios Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açu. Em cada estuário, foram estudados dois pontos internos, localizados a 2 e 4 km da foz, e quatro pontos externos (área marinha adjacente), sendo o primeiro localizado a 2 km da foz e os demais a 4 km da foz, em forma de cruz. Visando a integração entre Anexos e a investigação acerca de potenciais impactos do rejeito nas assembleias de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos, foram adicionados 11 pontos de coleta à malha amostral do Anexo 7 na fase de transição, aqui chamados “Pontos novos”, todos localizados em áreas externas aos estuários (Figura 2). Estes pontos são também monitorados quanto à presença de indicadores do rejeito (por exemplo, Fe, Mn, As e Cr, entre outros) pela equipe do Anexo 3 do PMBA/Fest-RRDM. Por meio da integração de dados entre Anexos, no futuro será possível determinar o efeito relativo do rejeito e de variáveis ambientais, tais como profundidade, salinidade e temperatura da água, na composição das assembleias de peixes estuarinos/marinhos na área impactada. Além disso, os pontos RD7, RD8 e RD9 foram excluídos das amostragens, uma vez que estes pontos se encontravam em profundidades muito maiores que os demais, dificultando a operação da rede de arrasto de fundo, causando viés nas amostragens e impossibilitando comparações com os demais estuários. Os pontos amostrados no Ano 1 estão na Tabela 1 e aqueles amostrados na Transição estão na Tabela 2.

Devido a pandemia de COVID-19, os trabalhos de campo e laboratório foram interrompidos, visando a preservação da saúde não só dos membros das equipes, mas também das comunidades das localidades onde os estudos foram desenvolvidos.

Figura 2: Mapa da área de estudo exibindo os locais amostrados durante os estudos da ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas nas regiões direta (Rio Doce e área marinha adjacente) e indiretamente impactadas (rios Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açu), entre outubro/2018 e fevereiro/2020

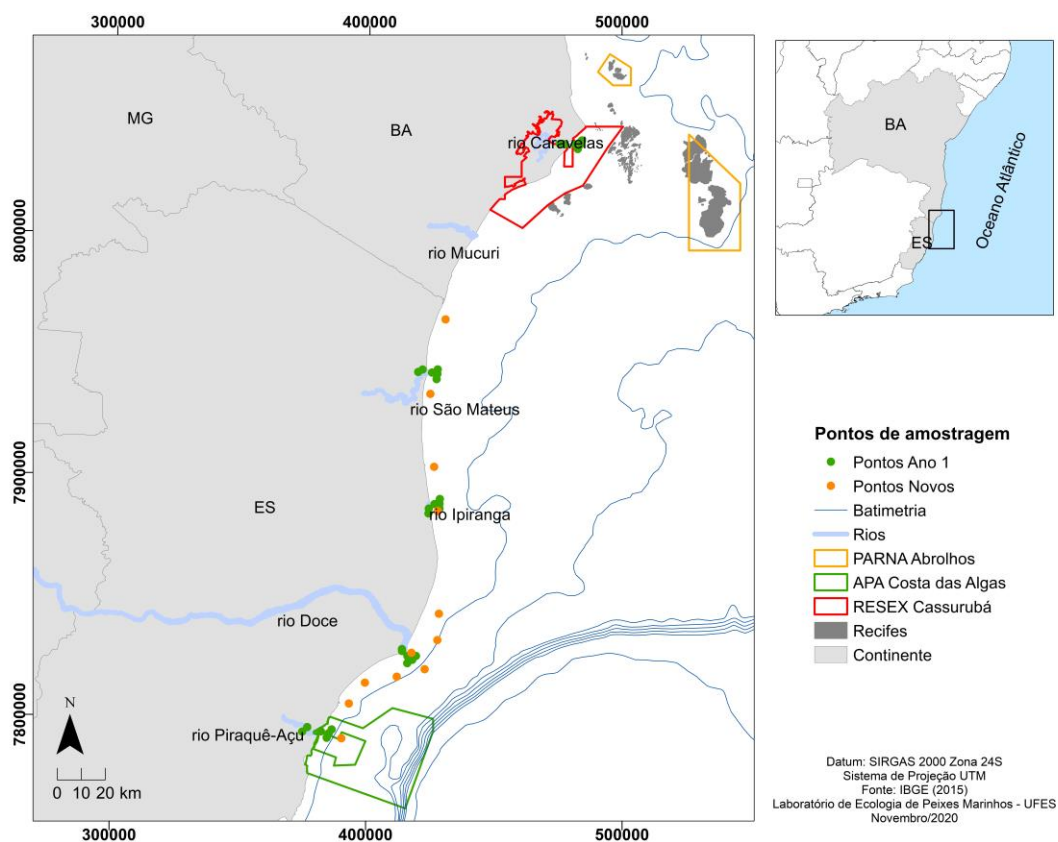


Tabela 1: Pontos de amostragem de peixes e crustáceos estuarinos/marinheiros durante o ano 1 (outubro/2018 a setembro/2019), entre o sul da Bahia e o norte do Espírito Santo. ****indicam os pontos excluídos das amostragens no período de após o ano 1 (transição, novembro-dezembro/2019 e fevereiro/2020)

Nome da estação amostral	Código da estação amostral	Northing	Easting
São Mateus	SM01	7942784,4	419729,6
São Mateus	SM02	7943784,9	421452,8
São Mateus	SM03	7942551,0	425158,0
São Mateus	SM04	7941979,6	427287,0
São Mateus	SM05	7943853,6	427435,5
São Mateus	SM06	7939871,0	426992,1
Ipiranga	IP01	7884327,8	424013,5
Ipiranga	IP02	7886336,0	424094,3
Ipiranga	IP03	7888255,9	426353,1
Ipiranga	IP04	7888328,9	428344,3
Ipiranga	IP05	7890307,3	428450,3
Ipiranga	IP06	7886351,4	428323,1
Caravelas	CA1	8037150,9	475405,8

Nome da estação amostral	Código da estação amostral	Northing	Easting
Caravelas	CA2	8037053,4	477401,9
Caravelas	CA3	8036975,5	481416,7
Caravelas	CA4	8036824,6	483414,2
Caravelas	CA5	8038597,4	484155,2
Caravelas	CA6	8035062,5	482490,6
Piraquê-açu	PA0	7793915,0	375019,0
Piraquê-açu	PA01	7795798,0	377029,0
Piraquê-açu	PA03	7794035,0	382331,0
Piraquê-açu	PA04	7793323,0	385460,0
Piraquê-açu	PA05	7794865,0	386549,0
Piraquê-açu	PA06	7791417,0	384598,0
Rio Doce	RD01	7828224,0	413859,0
Rio Doce	RD02	7827448,0	413884,0
Rio Doce	RD03	7825335,0	416012,0
Rio Doce	RD04	7823800,0	417877,0
Rio Doce	RD05	7825443,0	419357,0
Rio Doce	RD06	7822434,0	415948,0
Rio Doce	RD07****	7818070,3	423673,4
Rio Doce	RD08****	7827151,7	427261,9
Rio Doce	RD09****	7812452,2	415382,8

Tabela 2: Pontos de amostragem de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos no período de transição (novembro-dezembro/2019 e fevereiro/2020), entre o sul da Bahia e o norte do Espírito Santo. ****indicam os pontos incluídos nas amostragens após o ano 1

Nome da estação amostral	Código da estação amostral	Northing	Easting
São Mateus	SM01	7942784,4	419729,6
São Mateus	SM02	7943784,9	421452,8
São Mateus	SM03	7942551,0	425158,0
São Mateus	SM04	7941979,6	427287,0
São Mateus	SM05	7943853,6	427435,5
São Mateus	SM06	7939871,0	426992,1
São Mateus	ITA01****	7964547,0	430449,0
São Mateus	CB01****	7933756,0	424570,0
Ipiranga	IP01	7884327,8	424013,5
Ipiranga	IP02	7886336,0	424094,3
Ipiranga	IP03	7888255,9	426353,1
Ipiranga	IP04	7888328,9	428344,3
Ipiranga	IP05	7890307,3	428450,3
Ipiranga	IP06	7886351,4	428323,1
Ipiranga	BN02****	7903598,0	426147,0

Nome da estação amostral	Código da estação amostral	Northing	Easting
Ipiranga	BS01****	7885331,0	427648,0
Rio Doce	SDN13****	7842923,0	428269,0
Rio Doce	SDN30****	7832036,1	427721,0
Rio Doce	SD03****	7819937,0	422769,0
Rio Doce	SDS20****	7816813,0	411879,0
Caravelas	CA1	8037150,9	475405,8
Caravelas	CA2	8037053,4	477401,9
Caravelas	CA3	8036975,5	481416,7
Caravelas	CA4	8036824,6	483414,2
Caravelas	CA5	8038597,4	484155,2
Caravelas	CA6	8035062,5	482490,6
Piraquê-açu	PA0	7793915,0	375019,0
Piraquê-açu	PA01	7795798,0	377029,0
Piraquê-açu	PA03	7794035,0	382331,0
Piraquê-açu	PA04	7793323,0	385460,0
Piraquê-açu	PA05	7794865,0	386549,0
Piraquê-açu	PA06	7791417,0	384598,0
Rio Doce	RD01	7828224,0	413859,0
Rio Doce	RD02	7827448,0	413884,0
Rio Doce	RD03	7825335,0	416012,0
Rio Doce	RD04	7823800,0	417877,0
Rio Doce	RD05	7825443,0	419357,0
Rio Doce	RD06	7822434,0	415948,0
(Ponto novo)	CA 02****	7791253,0	390338,0
(Ponto novo)	SDS19****	7805649,0	393211,0
(Ponto novo)	SDS13****	7814269,0	399459,0
(Ponto novo)	SD 01****	7826708,0	417558,0

2.2 COLETA DE DADOS

2.2.1 Variáveis ambientais

Antes do início de cada arrasto foram mensuradas as seguintes variáveis ambientais: temperatura (°C), profundidade (m), salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD - ppm) da água. Para tanto, foi utilizada uma sonda multiparâmetro Horiba modelo U-52G (Figura 3). Para as medidas de fundo, a água foi coletada com auxílio de uma garrafa de Van Dorn.

Figura 3: Coleta de dados em campo para mensuração das variáveis ambientais utilizando sonda multiparâmetro



2.2.2 Amostragem de ictiofauna e carcinofauna

Peixes e crustáceos estuarinos/marinhos foram coletados em duas fases: mensalmente, entre outubro/2018 e setembro/2019, e trimestralmente em novembro e dezembro/2019, e fevereiro de 2020. Em cada ponto amostral, foram empregados três arrastos de cinco minutos cada, utilizando-se uma rede de arrasto de fundo com portas (tipo “balão” ou “wing trawl”), com as seguintes especificações: tralha superior PES 5mm com 8,62m de comprimento e tralha inferior PES 8mm com 10,25m de comprimento; peso do chumbo equivalente a 1,62kg, sendo 27 unidades de 60g; malha 13mm, fio 210/09 nas mangas e barriga; malha 5mm, fio 210/12 no saco. As portas são de madeira vazada com as dimensões de 70cm x 42cm e peso de 9,3 kg cada. A velocidade média dos arrastos foi padronizada em 3,7km/h (i.e. 2 mn/h).

Após a coleta, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína até eutanásia e em seguida acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados quanto ao ponto, arrasto, local e data de coleta. O material foi mantido resfriado e encaminhado para os laboratórios responsáveis, onde foram preservados congelados até o seu processamento.

No laboratório, os peixes foram medidos quanto ao comprimento total (CT, o mais próximo de 1 mm, tomado da ponta do focinho à extremidade da cauda) utilizando um ictiômetro. Para os camarões foram mensurados o comprimento da carapaça – CC (da região intraorbital à margem posterior) e o comprimento total – CT (da região da extremidade do rostro até a extremidade do télson) com auxílio de paquímetro (o mais próximo de 1 mm). Para os siris/caranguejos foram medidos o comprimento da carapaça – CC (do rostro à margem posterior da carapaça entre os últimos espinhos) e a largura da carapaça – LC (das margens da carapaça entre os últimos espinhos laterais), enquanto para os caranguejos, foram medidos LC e CC na porção mediana da carapaça, tanto longitudinalmente quanto transversalmente. Além disso, peixes e crustáceos foram pesados (o mais próximo de 0,01g).

2.3 ANÁLISES DE DADOS

Comunidades e populações de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos

O cálculo da densidade (número de indivíduos - n) e biomassa (g) de peixes e crustáceos por unidade de área (CPUA - Captura por Unidade de Área) foi feito dividindo-se a captura pela área varrida pela rede, multiplicadas por 100. A área varrida pela rede foi calculada por $A = D \cdot 10,25 \text{ m} \cdot 0,5$, onde: A = área varrida em metros; D = distância percorrida pela rede; 10,25 é o comprimento da corda da parte inferior da rede; 0,5 é o fator equivalente a área varrida no arrasto, conforme Barletta et al. (2005). Assim, a densidade foi expressa em número de indivíduos/100m², enquanto a biomassa foi expressa em g/100m².

Foram calculadas médias por área (interna – pontos 0, 1 e 2; externa – pontos 3, 4, 5 e 6) para cada região (Rio Doce, Caravelas, São Mateus, Ipiranga, e Piraquê-Açu) da densidade, biomassa, riqueza absoluta (S), diversidade de Shannon-Wiener ($H' \text{Log}_e$), equitatividade de Pielou (J'), e da densidade e biomassa das guildas tróficas. Os resultados foram descritos de acordo com as seguintes abordagens:

- **Diagnóstico (ano 1):** entre outubro/2018 e setembro/2019, coletas mensais com arrasto de fundo foram empregadas nos cinco estuários amostrados para a descrição preliminar das variações dos indicadores das comunidades e populações, tanto da ictiofauna quanto da carcinofauna;
- **Beyond BACI:** após a fase de diagnóstico foram realizadas duas coletas trimestrais nos mesmos pontos do ano 1, no período chamado “Transição”. Para a avaliação de impacto através do método *beyond BACI* (Underwood, 1992), foram considerados os dados de peixes e crustáceos coletados em todos os estuários nos meses de nov/2018 e fev/2019 (chamado período “T1”) da fase “Diagnóstico”, e aqueles provenientes dos meses de novembro (Caravelas, Ipiranga e São Mateus) e dezembro de 2019 (Piraquê-Açu e Rio Doce), e fevereiro/2020 (todos os estuários, período “T2”). Variações nos indicadores da comunidade entre T1 e T2, além da abundância e biomassa da espécie indicadora bagre-guri (*Genidens genidens*), foram descritas nesta abordagem.

Para detectar se houve diferenças espaço-temporais significativas nos descritores das comunidades, os dados foram submetidos a PERMANOVAs (ANDERSON, GORLEY, CLARKE, 2008), a partir de matrizes de similaridade de Bray-Curtis (dados multivariados) ou distância Euclidiana (dados univariados). Para o período “Diagnóstico” (ano 1), foram considerados quatro fatores: Mês (fixo), Estuário (fixo), Área (aleatório – aninhada em estuário) e Ponto (aleatório – aninhado em área). Para a abordagem *beyond BACI* foram considerados os fatores Período (fixo, T1 x T2), Local (fixo, controle x impacto), Estuário (aleatório – aninhado em local) e Área (aleatório, aninhada em estuário). Utilizou-se nessas análises a soma dos quadrados do Tipo III (parcial) e 5000 permutações. Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste “*a posteriori*” pareado, da mesma rotina, foi empregado. Para a descrição das variações espaço-temporais na densidade e biomassa, os dados foram transformados em sua raiz quadrada.

Com o intuito de visualizar diferenças na estrutura espacial da composição e abundância das espécies de peixes e crustáceos foram realizadas análises de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico

(nMDS) e Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis, com transformação de Hellinger e correção de Lingoes para os dados de abundância. De forma conjugada, os dados ambientais foram correlacionados às dimensões da ordenação com vetores calculados por meio do pacote *vegan* {*envfit*} (OKSANEN et al., 2019) na plataforma R (versão 3.6; R Core Team, 2019).

Modelos lineares baseados em distâncias (DistLMs) foram usados para analisar a relação da estrutura trófica das assembleias com as variáveis ambientais (profundidade, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH). Tais análises foram realizadas considerando as variáveis ambientais separadamente (testes marginais) e coletivamente (testes condicionais). Os testes condicionais foram feitos usando o procedimento de seleção *forward* e o critério de informação de Akaike (AIC), que balanceia a explicação do modelo (R^2) com o número de preditores incluídos. Os DistLMs foram baseados nos dados ambientais transformados em Log (x + 1) (exceto pH), 5000 permutações e em matrizes de similaridade de Bray-Curtis baseadas nos valores de densidade e biomassa das guildas tróficas, transformados em raiz quadrada (ANDERSON, GORLEY, CLARKE, 2008).

Informações adicionais sobre os procedimentos de campo e laboratório, e análise de dados estão disponíveis nos arquivos “Protocolos de análises RRDM” e “Protocolos de amostragens RRDM”.

2.4 FATOR DE CONDIÇÃO DE PEIXES ESTUARINOS/MARINHOS

2.4.1 Variação espacial na condição corporal (Ano 1)

A análise do fator de condição foi baseada em exemplares coletados nas áreas externas e internas às regiões dos rios Caravelas, São Mateus, Ipiranga, Doce e Piraquê-Açu nas campanhas mensais do Ano 1. As 14 espécies mais abundantes em comum entre as cinco regiões foram selecionadas. Larvas e juvenis que não atingiram a forma representativa da espécie (FROESE, 2006), ou seja, indivíduos de comprimento total inferior à média de comprimento de indivíduos com peso igual a 0,49, 0,50 e 0,51 g (Tabela 3) foram excluídos.

A hipótese nula é que, na escala regional do estudo (aproximadamente 300 km separam o rio Caravelas do Piraquê-Açu), os indivíduos da mesma espécie pertencem à mesma população. Tendo em vista que as amostragens do monitoramento estuarino da ictiofauna foram realizadas de forma concomitante em todas as regiões espera-se, portanto, que eventuais diferenças do fator de condição dos peixes sejam identificáveis através do Índice de Condição Residual (RCI), que corresponde ao resíduo da regressão linear entre o logaritmo do peso e o logaritmo do comprimento (e.g., SALVADOR & MUELBER, 2019). Esta regressão é usada para descrever a relação (não linear) entre peso e comprimento (FROESE, 2006). Desta forma, RCI positivo indica indivíduo "acima do peso" apresentando, portanto, melhor condição corporal. Este método apresenta notável vantagem sobre o uso do coeficiente de condição de Fulton (RICKER, 1975; NASH et al., 2006) que restritivamente assume uma relação isométrica entre peso e comprimento (ou seja, $b = 3$; ver abaixo). O método é, porém, dependente do número e da

amplitude de distribuição dos dados de tamanho (JOYEUX et al., 1992), assim como o coeficiente de condição relativo de Le Cren (1951), do qual ele deriva.

Tabela 3: Espécies selecionadas para análise de condição corporal e comprimento médio (CT, mm) dos indivíduos pesando 0,49–0,51 g

Espécie	Nome comum	CT médio (mm)
<i>Anchoa filifera</i>	manjuba	*
<i>Chirocentrodon bleekermanus</i>	sardinha-cachorra	51
<i>Conodon nobilis</i>	roncador	37
<i>Ctenosciaena gracilicirrus</i>	canguá	36
<i>Cynoscion jamaicensis</i>	goete	39
<i>Isopistus parvipinnis</i>	pescadinha	40
<i>Larimus breviceps</i>	oveva	37
<i>Odontognathus mucronatus</i>	sardinha	51
<i>Paralonchurus brasiliensis</i>	maria-luísia	43
<i>Pellona harroweri</i>	sardinha-olhuda	37
<i>Stellifer brasiliensis</i>	cangoá	39
<i>Stellifer rastrifer</i>	cangoá	38
<i>Stellifer stellifer</i>	cangoá	38
<i>Symphurus tessellatus</i>	linguado-foguete	41

*Sem indivíduos no intervalo 0,39–0,72 g. Portanto, todos os espécimes abaixo de 0,73 g foram removidos.

As estimativas para os parâmetros a e b da relação peso-comprimento $P=aCT^b$ (em inglês *length-weight relationship*; LWR) das espécies selecionadas foram calculadas através de regressão linear após transformação logarítmica das variáveis P (peso) e CT (comprimento total) (FROESE, 2006), ou seja:

$$\ln(P) = \ln(a) + b \cdot \ln(CT).$$

Valores atípicos (*outliers*) foram determinados como observações apresentando resíduo, diferença entre valor esperado e o valor observado de $\ln(P)$, superior em valor absoluto a três desvios padrão (dos resíduos). Para cada regressão foram produzidos histogramas de frequência dos resíduos (*i.e.*, RCI), o gráfico de dispersão dos resíduos vs. valor esperado para $\ln(P)$ e o gráfico de dispersão $\ln(P)$ vs. valor esperado para $\ln(P)$ a fim de detectar observações discrepantes. Por último, estes dados foram corrigidos ou excluídos antes de computar novas regressões lineares e obter estimativas confiáveis para os parâmetros a e b .

O RCI foi testado via ANOVAs paramétricas usando como variável independente “Região” (cinco níveis) e considerando a soma dos quadrados de tipo III. A normalidade dos dados foi avaliada por testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk. Uma eventual não-normalidade não necessariamente impede o uso de estatísticas paramétricas, sendo estas bastante robustas a desvios nos pré-requisitos. A homogeneidade das variâncias entre categorias foi testada pelo teste de Levene. Diferenças par-a-par entre categorias foram avaliadas com teste *post-hoc* Tamhane T2, assumindo variâncias diferentes

(heterocedasticidade). É importante ressaltar que este tipo de teste *post-hoc* somente pode ser realizado em ANOVAs com um único fator (neste caso, “Região”). Para corroborar, ou não, os resultados das análises paramétricas foram realizadas ANOVAs não paramétricas de Kruskal-Wallis (KW) e Mann-Whitney, com 5000 permutações de Monte-Carlo. Os grupos homogêneos construídos a partir dos resultados dos testes T2 foram transformados em *ranks*, incluindo *ranks* intermediários quando o local estava presente em dois grupos homogêneos. A ordem dos *ranks* médios nos testes KW também foi transformada em *ranks*. Nos dois casos, a soma dos *ranks* indica onde cada região se situa no universo dos RCIs assumindo peso igual para as oito espécies. Para os casos do número de indivíduos de uma mesma espécie superior a 50 em ambas as áreas (interna e externa) de uma dada região, o RCI foi testado via ANOVAs paramétricas usando como variável independente a área (dois níveis) considerando a soma dos quadrados de tipo III e via ANOVAs não paramétricas de Mann-Whitney, com 5.000 permutações de Monte-Carlo. Para cada espécie, o RCI médio mensal foi calculado por região e para a área de estudo baseado no pressuposto que os indivíduos de cada espécie pertencem à mesma população. Neste último caso, foi estimado o intervalo de confiança da média estimada, determinando se esta estimativa era significativamente diferente de zero. A codificação apresentada (-: < 0; +: > 0; NS: não significativamente diferente de zero) não permite análise estatística e foi modificada para - = -1, + = +1 e NS = 0. Os padrões temporais foram ilustrados pela variação mensal do RCI para as 14 espécies testadas.

2.4.2 Análise multivariada: espaço, tempo, ambiente e poluentes (Ano 1)

As variações espaciais (“região” e “área”), temporais (“mês”), específica e ambiental foram integradas construindo um modelo em duas etapas. A primeira consiste na elaboração de uma Árvore de Classificação adequada em fornecer uma descrição ao mesmo tempo complexa e interpretável sobre a variação do RCI no espaço, no tempo e entre espécies. A segunda etapa consiste em uma Análise Discriminante adequada em correlacionar essa descrição a variáveis ambientais e a poluentes.

Primeiramente, foi criada uma Árvore de Classificação analisando o RCI em função das variáveis região, área e mês. Foram removidas as espécies cuja relação peso-comprimento apresentou $r^2 < 0,95$ (*Anchoa filifera* e *Chirocentodon bleekermanus*). Os RCIs individuais remanescentes [N = 19423, com 1114 (5,7%) nas áreas internas e 18309 (94,3%) nas áreas externas] foram centralizados (média = 0) e normalizados (desvio padrão = 1) independentemente para as 12 espécies. O conjunto completo desses Z-scores foi partilhado em cinco quintis, *i.e.*, RCI ruim $\leq -0,72$, medíocre, normal, bom, ótimo $\geq +0,74$) visando à classificação destes em função de “mês” (variável ordinal; N = 12), “região” (categorial; N = 5), “área” (categorial; N = 2), “espécie” (categorial, N = 12). Nota-se que o nome atribuído ao quintil tem como função única de distinguir um do outro e não tem valor qualitativa *per se*. O método CRT (Árvore de Classificação e Regressão) foi usado pela sua capacidade em buscar uma maior homogeneidade interna nos nodos utilizando uma medição de impureza (*impurity measure*) dicotômica chamada *Ordered Towing* onde, quando a variável é ordinal, somente as categorias adjacentes podem ser agrupadas. Para reduzir a influência das espécies mais comuns, foi aplicado um peso específico às observações:

$$Peso(Espécie\ i) = \sqrt[3]{\frac{N_{max}}{N_i}}$$

onde N_{max} é o número de indivíduos da espécie mais abundante e N_i o número de indivíduos da Espécie i . Probabilidades *Priors* foram estabelecidas em 0,20 para cada quintil, o número mínimo para partição em 1000, o número mínimo para grupo-descendente em 500, a melhoria (a estatística específica aos modelos CRT = *Improvement*) em 0,00005, custos de mis-classificação em 0 (zero) e 1 (um) dependente de o quintil predito pela classificação estar certo ou errado. A validação do modelo foi realizada pelo método de validação cruzada (*cross-validation*) usando 25 sub-amstras (*folds*). São produzidas 25 árvores, cada uma computada usando 24 *folds* (em um processo semelhante à técnica de reamostragem chamada de *Jackknifing*). No final é produzida uma única árvore final de consenso cujo risco (*crossvalidated risk*) é a média dos riscos das 25 árvores.

Os parâmetros da amostragem ictiológica pelo PMBA/Fest-RRDM foram medidos para cada arrasto triplicado e, caso exceção, consistem em seis medições nas áreas internas (dois sítios em cada estuário) e doze ou mais medições nas áreas externas (pelo menos quatro sítios na zona costeira frente a cada estuário). Os parâmetros utilizados do PMBA/Fest-RRDM foram temperatura (C°), pH da água, turbidez (NTU), oxigênio dissolvido (%), salinidade (ppt), todas as medidas foram realizadas no fundo, e profundidade (m). Adicionalmente, dados de amostragens mensais de sedimento oriundas do Programa de Monitoramento Quali-Quantitativo Sistemático de Água e Sedimentos (PMQQS) foram incorporadas para o mesmo período (outubro 2018 até setembro 2019). A mediana das duas réplicas coletadas para cada parâmetro (listado abaixo) foi usada como valor para a amostra e a média das duas amostras coletadas em cada sítio como valor para o parâmetro. De maneira geral, foram escolhidos dois sítios na área externa de cada estuário e dois em áreas internas a eles. Exceções são Caravelas X Área interna (1 sítio), Rio Doce X Área interna (1 sítio) e Rio Doce X Área externa (3 sítios) (Quadro 1). Os parâmetros extraídos do PMQQS foram Espessura de rejeito depositado (mm), Teor (em %) de Umidade, de Carbonatos e de Carbono orgânico total; Proporção (em %) de Granulo (4 a 2 mm), Areia muito grossa (2 a 1 mm), Areia grossa (1 a 0,5 mm), Areia média (0,5 a 0,25 mm), Areia fina (0,25 a 0,125 mm), Areia muito fina (0,125 a 0,062 mm), Silte (0,062 a 0,00394 mm) e Argila (0,00394 a 0,0002 mm); Concentração (em mg/kg) de Alumínio, Antimônio, Arsênio, Bário, Berílio, Boro, Cádmio, Chumbo, Cobalto, Cobre, Cromo, Estrôncio, Ferro, Fósforo total, Manganês, Mercúrio, Molibdênio, Níquel, Nitrogênio total, Prata, Selênio, Vanádio e Zinco; pH e Potencial redox (mV) do sedimento. Concentrações referentes ao limite de detecção foram, como é de praxe, trocadas pelo valor zero. Dados faltantes da amostragem de água não precisaram ser estimados devido à triplicagem em cada sítio. Dados faltantes da amostragem de sedimento são limitados à espessura do sedimento em todos os locais, exceto Piraquê-Açu em agosto 2019 e foram trocados pela mediana para a variável (= 0).

Quadro 1: Localidades e pontos de amostragem de dados sedimentares e teores de elementos realizados pelo programa PMQQS escolhidos para descrever os locais e áreas do presente estudo

Sítio PMQQS - Município - Localidade e ponto	Região (presente estudo)	Área (presente estudo)
Caravelas - Ponta de Areia	Caravelas	Externa
Nova Viçosa - Nova Viçosa	Caravelas	Externa
Caravelas - Estuário Rio Caravelas	Caravelas	Interna
São Mateus - Iraúnas	São Mateus	Externa
São Mateus - Guriri	São Mateus	Externa
Conceição da Barra - Estuário Cricaré 02	São Mateus	Interna
Conceição da Barra - Estuário Cricaré 01	São Mateus	Interna
São Mateus - Urussuquara	Ipiranga	Externa
Linhares - Pontal do Ipiranga	Ipiranga	Externa
Linhares - Estuário Rio Ipiranga 01	Ipiranga	Interna
Linhares - Estuário Rio Ipiranga 02	Ipiranga	Interna
Linhares - Povoação	Rio Doce	Externa
Linhares - Regência 02	Rio Doce	Externa
Linhares - Regência 01	Rio Doce	Externa
Linhares - Estuário Rio Doce 01	Rio Doce	Interna
Aracruz - Padres	Piraquê-Açu	Externa
Aracruz - Refúgio	Piraquê-Açu	Externa
Aracruz - Estuário Piraquê-Açu 02	Piraquê-Açu	Interna
Aracruz - Estuário Piraquê-Açu 01	Piraquê-Açu	Interna

Os nós terminais da CRT identificados como combinações de Mês X Região X Assembleia (o conjunto de espécies que caracteriza cada nó terminal) a partir da análise de classificação foram associados com os dados das amostragens da água do PMBA/Fest-RRDM e de sedimento do PMQQS disponíveis mensalmente nos cinco locais e nas duas áreas (interna aos estuários e externa a estes na isóbata de 10 m). O conjunto de variáveis ordinais (Mês) e categóricas (as demais) oriundas da CRT foi duplicado para possibilitar a inserção da variável Área. Foi seguida a estrutura da árvore para realizar a análise discriminante (com exceção da inserção da Área) devido à dificuldade de codificar adequadamente as regras de classificação, resultando em 234 combinações Mês X Região X Área X Assembleia. As combinações representando coletas sem captura de indivíduos das 12 espécies-alvo (11 coletas mensais no Ipiranga, 3 no São Mateus, 1 no Caravelas e 1 no Piraquê-Açu, todas nas áreas internas aos estuários) foram associadas a um pseudo-nó 'Sem peixe', visto que não participaram na construção da Árvore de Classificação. As 234 combinações foram associadas às 120 combinações Mês X Região X Área dos dados de água, profundidade, frações sedimentares, concentração de elementos e dados químicos totalizando 6 variáveis oriundas do PMBA/Fest-RRDM e 37 variáveis oriundas do PMQQS, todas contínuas. Observações evidenciando duplicação de dados ambientais foram removidas. Assim, os nós 8 e 12 foram deletados da análise porque seus dados ambientais duplicam os nós 7 e 11, respectivamente, enquanto as assembleias se referem à totalidade das

espécies usadas na CRT. As observações foram associadas aos pseudo-nós 'Nó 7-8' e 'Nó 11-12'. Todas as observações duplicadas dentro do pseudo-nó 'Sem peixes' foram removidas já que são baseadas em diferenças entre assembleias inexistentes. Outras observações com dados ambientais duplicados, em particular entre nós 15 e 17, 15 e 18 e também 20 e 23, foram deixadas por representarem sobreposições parciais e não exclusivas dos nós terminais, em particular relativamente às assembleias. Os dados finais apresentam 173 combinações Mês X Região X Área X Assembleia associadas às 120 combinações Mês X Local X Área.

As variáveis ambientais independentes foram transformadas antes da Análise Discriminante. Variáveis com menos de nove valores distintos foram transformadas em variáveis ordinais (Espessura de Rejeito e teores de Antimônio, Cádmio, Prata e Selênio). Depois de atribuir aos outliers (além de três desvios padrão, D.P.) o valor do *cutoff* (média \pm 3 D.P.), as outras variáveis foram submetidas a uma dupla transformação iniciada por Box-Cox e seguida de Z-scores (visando alcançar média = 0,0 e D.P. = 1,0). Uma vez transformada por Box-Cox, a variável x ($x \geq 0$) toma a forma

$$T(x) = \frac{(x^\lambda - 1)}{\lambda} \quad \text{se } \lambda \neq 0$$

e

$$T(x) = \ln(x) \quad \text{se } \lambda = 0$$

Note que a correlação (não linear) entre variável original e variável transformada por Box-Cox é positiva independente do sinal de λ e que a transformação Z-scores aplicada em seguida tem a mesma propriedade.

A análise discriminante foi baseada no método clássico onde todas as variáveis são entradas de vez providenciado elas satisfazem uma dada tolerância (0,05). Probabilidades *Priors* foram baseadas no tamanho do grupo (número de observações para o nó). Foram considerados significativos coeficientes padronizados para as funções discriminantes canônicas \geq ou $> 0,8$. O mesmo valor de significância foi aplicado às funções nos centroides dos nós.

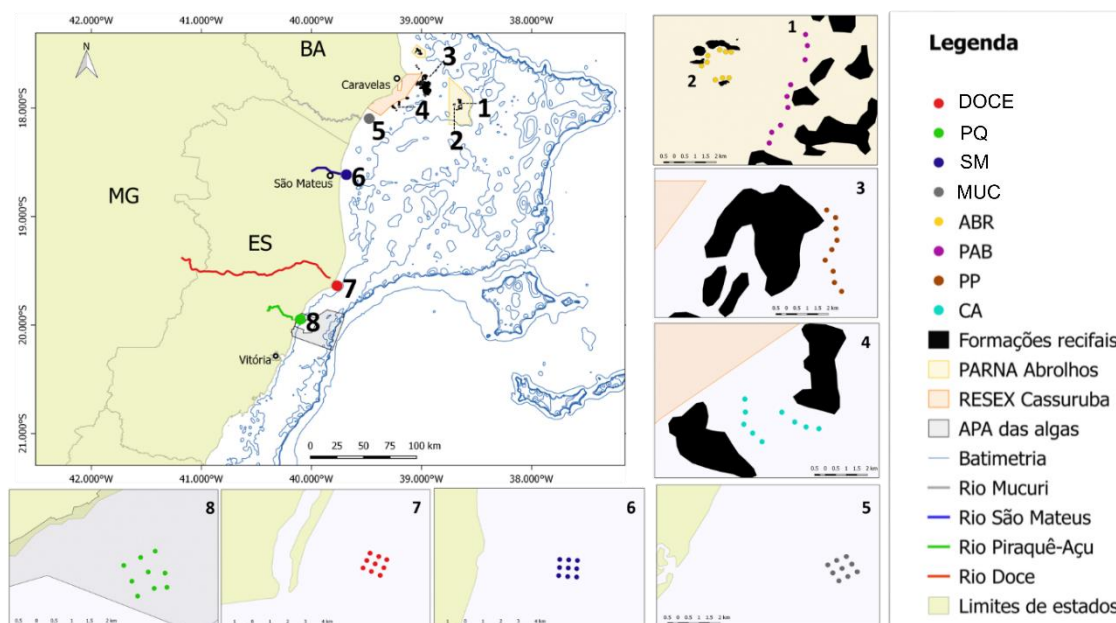
De maneira geral, as análises acima foram empregadas segundo Zar (1999).

2.5 RECRUTAMENTO DA ICTIOFAUNA

2.5.1 Área de estudo e amostragem

A malha amostral não sofreu modificação durante o período de transição. Para o monitoramento do recrutamento larval de peixes nos ambientes estuarinos, quatro regiões foram amostradas: foz do Rio Doce (zona Impacto), foz do rio Piraquê-Açu (Controle 1), foz do rio São Mateus (Controle 2) e foz do rio Mucuri (Controle 3). Para o monitoramento nos ambientes recifais, as amostragens foram realizadas nos Recifes de Coroa Vermelha e Nova Viçosa denominado como "Cassurubá" (CA), Parcel das Paredes (PP), Arquipélago de Abrolhos (ABR) e Parcel dos Abrolho (PAB) (Figura 4).

Figura 4: Mapa destacando as zonas de monitoramento dos ambientes recifais (1 a 4) e estuarinos (5 a 8). 1= Arquipélago de Abrolhos (ABR), 2= Parcel dos Abrolho (PAB), 3= Cassurubá (CA), 4= Parcel das Paredes (PP), 5= foz do Rio Mucuri (MUC), 6= foz do Rio São Mateus (SM), 7= foz do Rio Doce (Doce) e 8= foz do Rio Piraquê-Açu (PQ)



A frequência amostral nos ambientes estuarinos foi alterada durante o período de transição, passando de semestral para trimestral. Contudo, devido as paralisações decorrentes da pandemia (Covid 19) apenas uma campanha (dez/2019) foi realizada durante o período de Transição nos ambientes estuarinos. As coletas de pós-larvas de peixes nos ambientes estuarinos ocorreram em dezembro/2018, maio/2019 e dezembro/2019 (Tabela 4). Nos ambientes recifais, a frequência amostral não foi alterada durante o período de transição. Nesses ambientes, as coletas de pós-larvas de peixes ocorreram em janeiro e fevereiro/2019, agosto e setembro/2019 e março/2020 (Tabela 5). A duração de cada campanha foi variável devido a problemas de navegação (mecânico ou climáticos). Todavia, isso não comprometeu o número de amostras (esforço amostral), que foi o mesmo (duas noites) em todas as zonas e campanhas de amostragem.

Tabela 4: Data de execução das amostragens de pós-larvas de peixes nos ambientes estuarinos durante dezembro/2018, maio/2019 e dezembro/2019

Local (foz)	Zona	Dez/2018	Maio/2019	Dez/2019
Rio Doce	Impacto	12/12/2018	13/05/2019	23/12/2019
Rio Doce	Impacto	13/12/2018	14/05/2019	24/12/2019
Rio Piraquê-Açu	Controle 1	10/12/2018	11/05/2019	25/12/2019
Rio Piraquê-Açu	Controle 1	11/12/2018	12/05/2019	26/12/2019
Rio São Mateus	Controle 2	04/12/2018	07/05/2019	27/12/2019
Rio São Mateus	Controle 2	05/12/2018	08/05/2019	28/12/2019
Rio Mucuri	Controle 3	01/12/2018	05/05/2019	21/12/2019
Rio Mucuri	Controle 3	02/12/2018	06/05/2019	22/12/2019

Tabela 5: Data de execução das amostragens de pós-larvas de peixes nos ambientes recifais durante janeiro e fevereiro/2019, agosto e setembro/2019 e março/2020. NA= não amostrado no período

Local (recifes)	Zona	Jan-Fev/2019	Ago-Set/2019	Mar/2020
Arquipélago de Abrolhos	ABR	27/01/2019	27/08/2019	08/03/2020
Arquipélago de Abrolhos	ABR	28/01/2019	28/08/2019	09/03/2020
Parcel dos Abrolhos	PAB	29/01/2019	29/08/2019	10/03/2020
Parcel dos Abrolhos	PAB	30/01/2019	30/08/2019	11/03/2020
Cassurubá	CA	08/02/2019	09/09/2019	NA
Cassurubá	CA	09/02/2019	10/09/2019	NA
Parcel das Paredes	PP	13/02/2019	02/09/2019	15/03/2020
Parcel das Paredes	PP	14/02/2019	03/09/2019	16/03/2020

Para a captura das pós-larvas de peixes, foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CARE® (ECOCEAN, Figura 5). Essas armadilhas são compostas de três partes: sistema flutuante / impermeável (que permite que a armadilha fique na superfície da água), parte de iluminação (18 horas de duração da luz, bateria recarregável de chumbo selada 12V/12, Temporizador de 12V), e a parte de coleta das pós-larvas (rede cônica de malha 2 x 2 mm, coletor de PVC fixado na extremidade da rede) (Figura 5, Figura 6). Nove armadilhas foram instaladas em pontos pré-estabelecidos dentro de cada local de amostragem (Figura 6). A instalação das unidades ocorreu antes do pôr do sol e a recuperação no amanhecer, durante duas noites consecutivas, totalizando 18 amostras em cada local por campanha. As armadilhas foram instaladas na superfície em posição vertical com auxílio de uma âncora, ligadas por cabos e correntes a uma boia de sinalização (LECAILLON, 2004) e com uma distância de aproximadamente 300 m entre armadilhas (CATALÁN et al., 2014; FÉLIX-HACKRADT et al., 2013).

Após 12 horas de imersão, as armadilhas foram retiradas e as amostras coletadas foram transferidas para potes (devidamente etiquetados com informações sobre a data, hora e local da coleta) contendo álcool 70% para a sua preservação (FÉLIX-HACKRADT et al., 2013). Após a coleta, as amostras foram levadas até o laboratório de Ecologia e Conservação Marinha da UFSB, Porto Seguro-BA. Neste, as larvas foram triadas, mensuradas, pesadas e identificadas segundo bibliografia atualizada (RICHARDS, 2006; BONECKER et al., 2006; BONECKER et al., 2014).

Concomitante às coletas de recrutamento larval, variáveis físico-químicas (temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e turbidez) foram mensuradas utilizando uma sonda multiparâmetros Horiba. A profundidade do local de instalação das armadilhas foi obtida com sonar da embarcação e as variáveis meteoceanográficas (altura de ondas, direção e intensidade do vento, direção e intensidade da corrente, % iluminada da lua, etc.) foram obtidas através de visualização direta ou extraídos no portal do Centro de Previsão de tempo e Estudos Climáticos (CPTEC: www.cptec.inpe.br) e Surf guru (www.surfguru.com.br) (Figura 7). Devido a um possível problema de calibração do sensor de turbidez da sonda multiparâmetro nas duas últimas campanhas realizadas nos ambientes estuarinos, o coeficiente de atenuação difusa (KD490 nm) foi acessado via sensoriamento remoto e utilizado como proxy da turbidez. Para isso, os dados do sensor MODIS-Aqua (Level-3, 8-day period) disponibilizado

pelo portal Oceancolor da NASA (<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov/l3/order/>) foram processados no software SeaDAS (Seadas-7.5.3).

Figura 5: Representação dos componentes de uma armadilha luminosa tipo CARE® (ECOCEAN) indicando, (A) sistema flutuante/impermeável, (B) parte de iluminação e (C) rede cônica

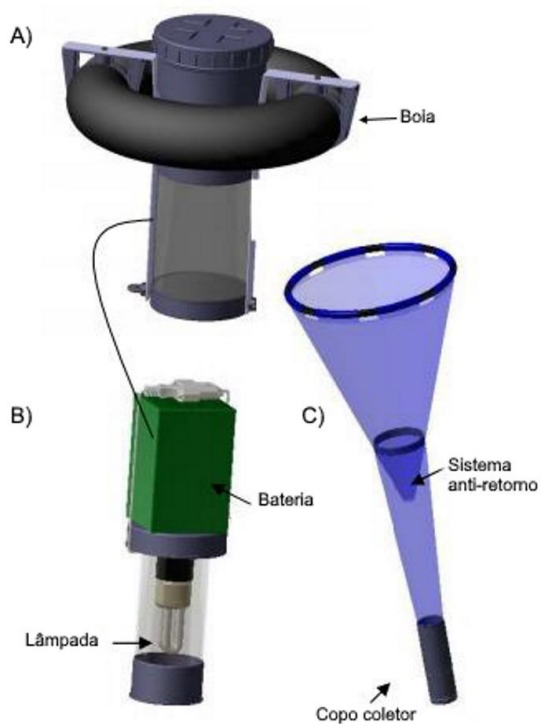


Figura 6: Armadilhas luminosas do tipo CARE® (ECOCEAN) em funcionamento

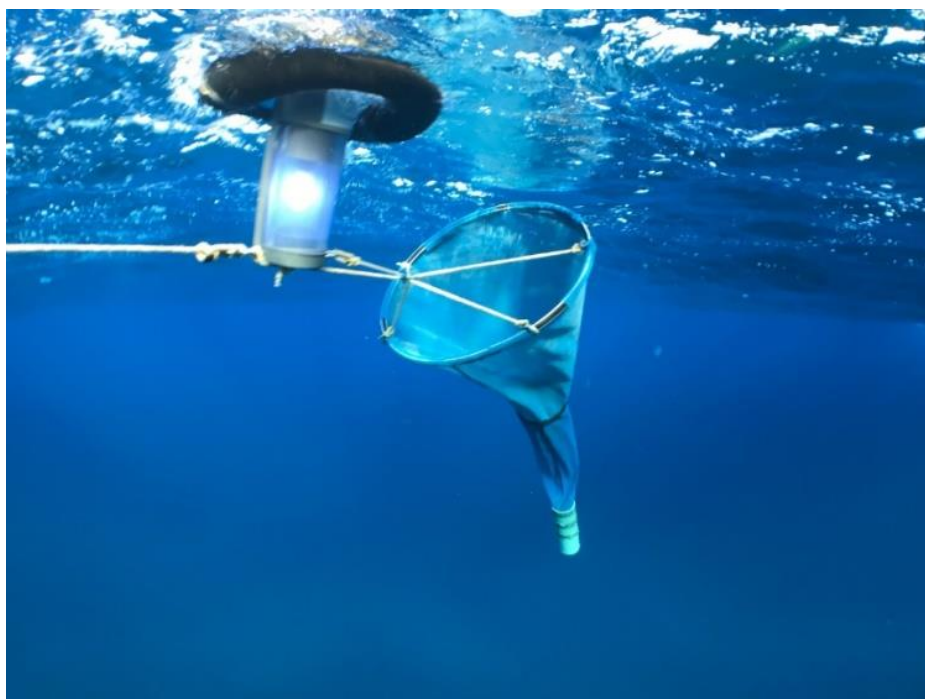


Figura 7: Registro fotográfico das amostragens. A) Armadilha luminosa sendo recolhida após 12 h de imersão. B) Representação das amostras coletadas. C e D) Mensuração e registro dos dados físico-químicos e meteoceanográficos



Tabela 6: Pontos de coletas pré-estabelecidos para o monitoramento do recrutamento da ictiofauna nas zonas dos ambientes estuarinos e recifais. Coordenadas em UTM/SIRGAS2000

Ambiente	Zona	Código	Leste	Norte
Estuarino	Rio Doce	LTI-1	418951.00	7828145.00
		LTI-2	419159.00	7828602.00
		LTI-3	419390.00	7829045.00
		LTI-4	419420.00	7827938.00
		LTI-5	419632.00	7828396.00
		LTI-6	419833.00	7828849.00
		LTI-7	419921.00	7827704.00
		LTI-8	420127.00	7828164.00
		LTI-9	420289.00	7828652.00
	Rio Piraquê-Açu	LTC1-1	384185.00	7794216.00
		LTC1-2	384417.00	7793738.00
		LTC1-3	384583.00	7793288.00
		LTC1-4	384662.00	7794461.00
		LTC1-5	384877.00	7794020.00
		LTC1-6	385049.00	7793527.00
		LTC1-7	385071.00	7794652.00
		LTC1-8	385352.00	7793992.00
		LTC1-9	385408.00	7793560.00
	Rio São Mateus	LTC2-1	427561.73	7942247.08

Ambiente	Zona	Código	Leste	Norte
		LTC2-2	428067.19	7942226.16
		LTC2-3	428558.36	7942194.62
		LTC2-4	427548.03	7941765.64
		LTC2-5	428042.79	7941737.85
		LTC2-6	428519.72	7941699.46
		LTC2-7	427502.41	7941277.61
		LTC2-8	428010.93	7941221.51
		LTC2-9	428516.35	7941197.08
	Rio Mucuri	LTC3-1	449049.44	7999257.60
		LTC3-2	449471.83	7999497.69
		LTC3-3	449935.89	7999704.06
		LTC3-4	449291.61	7998832.68
		LTC3-5	449731.85	7999070.76
		LTC3-6	450197.35	7999298.59
		LTC3-7	449580.42	7998411.42
		LTC3-8	450010.24	7998643.89
		LTC3-9	450454.95	7998892.60
Recifal	Arquipélago de Abrolhos	LTC1-1	530704	8012777
		LTC1-2	531022	8012998
		LTC1-3	531241	8013291
		LTC1-4	531339	8012223
		LTC1-5	531762	8012222
		LTC1-6	532080	8012222
		LTC1-7	531648	8013531
		LTC1-8	532061	8013462
		LTC1-9	532539	8013461
	Parcel dos Abrolhos	LTC2-1	535610	8014900
		LTC2-2	535455	8015243
		LTC2-3	535368	8015457
		LTC2-4	535220	8015589
		LTC2-5	535435	8014586
		LTC2-6	535443	8014474
		LTC2-7	535312	8014346
		LTC2-8	535230	8014230
		LTC2-9	535164	8014125
	Cassurubá	LTC3-1	474771	8012988
		LTC3-2	474794	8012352
		LTC3-3	474723	8011755
		LTC3-4	475143	8011324
		LTC3-5	475587	8010887
		LTC3-6	476527	8012349

Ambiente	Zona	Código	Leste	Norte
		LTC3-7	477138	8011870
		LTC3-8	477679	8011629
		LTC3-9	478291	8011543
	Parcel das Paredes	LTC4-1	424493	7961845
		LTC4-2	416911	7971526
		LTC4-3	440272	7972197
		LTC4-4	431619	7987228
		LTC4-5	421041	7988070
		LTC4-6	438599	7990939
		LTC4-7	429574	7992415
		LTC4-8	420978	7989155
		LTC4-9	436287	7987920

2.5.2 Análises de dados

O delineamento amostral e analítico para as avaliações de impacto adotou o método *beyond-BACI* (UNDERWOOD, 1991, 1992, 1993, 1994). Para o método escolhido, a foz do Rio Doce (denominada "Zona Impacto") teve sua variância comparada com áreas adjacentes semelhantes em estrutura e distantes da área de interesse (denominada "Controle"). Seguindo o desenho amostral e analítico adotado, as diferenças foram avaliadas através do contraste da variância da zona Impacto vs a somatória das variâncias das zonas Controle (ANDERSON, GORLEY, CLARKE, 2008).

Para o comparativo, foram realizadas análises de variância por permutação (PERMANOVA), de maneira multivariada, para a estrutura da assembleia de peixes (composição e abundância de espécies), e de forma univariada para a abundância total, biomassa total, comprimento total (CT) médio, riqueza de espécies (S), diversidade de Shannon-Wiener (H'), equitatividade de Pielou (J), e diversidade alfa (0D, 1D e 2D). Todas as métricas univariadas foram calculadas por amostra, ou seja, por unidade de esforço (CPUE). Para as análises de variância, os valores de abundância e biomassa foram transformados por $\log(x+1)$. As análises univariadas e multivariadas foram baseadas na matriz de similaridade de Bray-curtis. Para ambos modelos, a soma dos quadrados foi do tipo I (sequencial), no qual os efeitos fixos somam zero para termos mistos. *P* valores foram obtidos usando 9999 permutações. Os fatores incluídos nos modelos foram: Tempo (3 níveis, aleatório) e Zona (Fixo, ortogonal com o Tempo, com 4 níveis). Para o ambiente estuarino foi adicionada uma análise de contraste (Impacto vs Controles) aos modelos delineados, onde a variância da zona Impacto foi comparada com a somatória das variâncias das zonas Controle. Considerando o objetivo dos indicadores, as interpretações das análises de variância foram baseadas, majoritariamente, no contraste Impacto vs Controles (ANDERSON, GORLEY, CLARKE, 2008). As análises de variância por permutação foram feitas no software Primer (versão 6.1.13).

Para visualizar as diferenças na composição e abundância de espécies (*taxa*) de pós-larvas de peixes entre as zonas de monitoramento, foi utilizado o Diagrama de Escalonamento Multidimensional Não-

Métrico (NMDS), com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis com os dados de abundância transformados por $\text{Log}(x+1)$. Adicionalmente, os dados ambientais e as espécies (*taxa*) foram correlacionados as dimensões da ordenação. Os vetores das variáveis contínuas foram ajustados à ordenação, com o comprimento da seta proporcional à correlação obtida. Nos gráficos foram apresentados apenas as variáveis que exibiram correlação significativa ($P < 0,01$). Para as ordenações e análises de correlação (envfit) o pacote vegan (OKSANEN et al., 2019) foi utilizado no ambiente R (versão 4.0.1; R Core Team, 2020).

Para avaliar a eficiência do esforço amostral realizado em representar a riqueza de espécies para cada zona de monitoramento, curvas de rarefação foram desenvolvidas utilizando dados de incidência baseados em unidades de amostragem. Intervalos de confiança (*bootstrap*) em torno da riqueza para amostras rarefeitas/extrapoladas foram plotados para facilitar as comparações entre as zonas de monitoramento. A rarefação e extrapolação da riqueza de espécies com base no tamanho da amostra foram calculadas utilizando o pacote iNext (CHAO & JOST, 2012) no ambiente R (versão 4.0.1; R Core Team, 2020).

Buscando aprofundar o efeito do impacto sobre a diversidade das comunidades nos estágios de pós-larvas, aplicamos um índice de diversidade verdadeira (*sensu* JONES, 2006, 2007), considerando que o número efetivo de espécies é equivalente ao número de Hill (qD) (HILL, 1973) onde, a diversidade poder ser quantificada como espécies igualmente abundantes, com base no aumento do peso da abundância pela ordem de diversidade q . Quando q igual a 0 (0D) as abundâncias são desconsideradas, o que favorece a representatividade de espécies raras; quando q é igual a 1 (1D) o valor de diversidade gerado equivale a entropia de Shannon e espécies comuns na comunidade têm representação mais efetiva; e quando q é igual a 2 (2D) um peso desproporcional é dado para abundância e as espécies dominantes são mais representativas (JOST, 2007). Os índices de diversidade foram calculados utilizando o pacote Entropart (HÉRAULT, 2015) no ambiente R (versão 4.0.1; R Core Team, 2020).

2.6 ISÓTOPOS ESTÁVEIS E DIETA

2.6.1 Coleta de dados e material biológico

Isótopos estáveis

A análise de isótopos estáveis teve por objetivo avaliar se a remobilização de contaminantes durante a estação chuvosa afeta a diversidade trófica da comunidade e de populações de organismos demersais que habitam o estuário do Rio Doce. Para tal, foram coletados os principais consumidores e produtores ao fim de duas estações (chuvosa e seca) no ano de 2019 nos estuários do Rio Doce e rio Piraquê-Açu (controle). As coletas na estação chuvosa ocorreram nos meses referentes ao fim do período de chuvas (fevereiro/março), enquanto que as coletas da estação seca foram realizadas ao fim do período seco e antes das chuvas começarem (agosto/setembro). Macro-consumidores (peixes, braquiúros e camarões) foram coletados principalmente por meio de arrasto de fundo tracionado, meso-consumidores (ermitões e gastrópodes) foram coletados via captura manual e os micro-consumidores

(zooplâncton e larvas de insetos) utilizando redes de zooplâncton e cores superficiais no sedimento. A matéria orgânica particulada foi coletada em amostras de água armazenadas em garrafas de vidro previamente esterilizadas e peneirada em malha 60 μm a fim de remover grandes partículas e zooplâncton. Posteriormente, as amostras, principalmente compostas por fitoplâncton e detritos, foram filtradas através de filtros de fibra de vidro (retenção de 0,7 μm) e o material retido foi destinado a secagem e maceração. Amostras de tecido muscular dos consumidores foram extraídas e também destinadas a secagem e maceração. Organismos diminutos (e.g. zooplâncton) foram preparados inteiros e posteriormente sub-amostras foram acidificadas com HCl para remoção de carbonatos. Todas as amostras foram secas em estufa a 60° C, maceradas com auxílio de gral e pistilo e encapsuladas em cápsulas de estanho.

Dieta

Os itens alimentares consumidos pelo bagre-guri, *Genidens genidens*, no estuário do Rio Doce foram analisados sob lupa Leica® com aumento de até 50x. Uma placa de petri com papel milimetrado (cada célula com 1 mm²) na sua parte inferior foi utilizada para quantificá-los (HELLAWELL & ABEL, 1970; ALBRECHT & CARAMASCHI, 2003). Os itens foram distribuídos uniformemente e a área (mm²) ocupada foi registrada. As presas foram identificadas com auxílio da literatura (BRUSCA & BRUSCA, 2003; RUPPERT & BARNES, 2004) e de especialistas. O elevado grau de digestão de algumas presas inviabilizou a identificação em menores níveis taxonômicos.

2.6.2 Análise de dados

Isótopos estáveis

Os valores obtidos de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ para os consumidores foram modelados de forma a computar três estimadores (mínimo polígono convexo, área padrão da elipse e densidade de Kernel) de diversidade trófica (i.e. nicho trófico) a partir da distribuição das assinaturas isotópicas em um espaço bivariado considerando três contornos de distribuição (50%, 75% e 95%). Peixes (espécies que somaram > 1% da abundância) e crustáceos de cada estação (chuvosa e seca) compuseram a comunidade em cada estuário. Para verificar se a diversidade trófica do Rio Doce foi inferior em períodos subsequentes às chuvas – que são consideradas eventos “gatilho” para remobilização e biodisponibilização do rejeito (veja HATJE et al., 2017; RUDORFF et al., 2018; CORDEIRO et al., 2019) – em decorrência de um novo impacto na teia trófica, os três estimadores foram comparados para o Rio Doce e o estuário “controle” (Piraquê-Açu).

A nível populacional, a diversidade trófica nas duas estações (chuvosa e seca) foi estimada a partir de modelo Bayesiano (SIBER; JACKSON et al., 2011) que minimiza os efeitos do tamanho amostral a fim de se obter valores robustos da diversidade trófica (i.e. nicho isotópico; SEAc) em uma dada área. O presente modelo gera elipses corrigidas, das quais é possível estimar a área ocupada no δ -espaço isotópico ($\delta^{13}\text{C}$ vs. $\delta^{15}\text{N}$) e, conseqüentemente, a diversidade trófica baseada nos níveis tróficos (N) e fontes consumidas (C) pelos indivíduos da população. Para a abordagem populacional foi utilizado o

bagre-guri, *Genidens genidens*, espécie mais importante (em biomassa e abundância) no estuário do Rio Doce. Adicionalmente, o modelo de mistura 'simmr' foi aplicado para verificar se o bagre-guri possui um padrão alimentar similar as populações da mesma espécie de outros estuários brasileiros. Para tal, um modelo de duas fontes foi elaborado visando estimar a contribuição relativa de fontes de baixo e alto valor energético. As potenciais fontes coletadas e analisadas foram baseadas em estudos prévios (e.g. CHAVES & VENDEL, 1996; RABITTO & ABILHÔA, 1999) e em análises preliminares da ecologia trófica de indivíduos coletados no Rio Doce. As fontes agrupadas na categoria 'baixo valor energético' foram zooplâncton (copepodes), larvas de inseto (Chironomidae) e fitoplâncton e na categoria 'alto valor energético' foram siris (*Callinectes* sp.), camarões (Penaeidae) e peixes (Engraulidae).

As análises isotópicas de ^{13}C e ^{15}N foram conduzidas usando um analisador elementar (FLASH 2000, Thermo Scientific) acoplado em um espectrômetro de massa de razão isotópica (Delta V Plus, Thermo Scientific, Bremen – Germany). Os resultados obtidos foram expressos em notação δ (‰) a partir dos valores de referência em acordo a equação $\delta X = [(R_{\text{amostra}}/R_{\text{referência}}) - 1] \times 10^3$. Onde X é ^{13}C ou ^{15}N , e R é a razão correspondente a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ou $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. A precisão analítica para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ foi de $< 0,15$ ‰ segundo USGS-24, IAEA-CH6, IAEA-600 para $\delta^{13}\text{C}$ e IAEA-N2, IAEA-NO-3, IAEA-600 para $\delta^{15}\text{N}$. Valores que apresentaram parcial enriquecimento por lipídios (C:N $> 3,5$) foram corrigidos (POST et al., 2007).

2.6.3 Dieta de *Genidens genidens* (bagre-guri) no Rio Doce

A área relativa (%AR) de cada presa nos estômagos foi calculada mediante a quantificação da área ocupada em relação a área total de todos os itens alimentares. Adicionalmente, a frequência de ocorrência (%FO) foi calculada (HYNES, 1950; HYSLOP, 1980).

O índice de área relativa foi considerado o mais adequado para este trabalho, visto que a maioria das presas era muito pequena para utilização do método volumétrico e com massa inferior ao limite mínimo de uma balança de precisão ($< 0,001$ g).

Segue abaixo as equações dos índices %AR e %FO, e do índice de importância alimentar (%I_a), adaptado de Elston et al. (2020).

$$\%AR_a = \frac{100 \times (\text{área presa}_a)}{\sum \text{área das presas}}$$

$$\%FO_a = \frac{100 \times (\text{n de estômagos com o item } j)}{\text{total de estômagos analisados}}$$

$$\%I_a = \frac{100 \times (\%AR_a + \%FO_a)}{\sum (\%AR + \%FO)}$$

Previamente as análises, foi elaborada uma curva de rarefação de espécies, com o auxílio do software PAST v. 4.03, utilizando o índice Mao Tao, para avaliar a suficiência amostral (COLWELL et al., 2004).

A curva foi gerada a partir de uma matriz com 65 indivíduos (amostras) e 32 categorias taxonômicas de presas.

A estratégia alimentar do bagre-guri foi avaliada por meio do diagrama de Costello adaptado (AMUNDSEN et al., 1996). Neste caso, a abundância específica foi substituída pela área específica ocupada por cada presa (P_i ; plotada no eixo y), calculada de acordo com a fórmula a seguir:

$$P_i = \frac{\sum A_i}{\sum A_t}$$

Em que, A_i representa a área ocupada pela presa i , e A_t é a área total de presas nos estômagos onde ocorreram a presa i .

O índice de Levins (B) e o índice padronizado (B_A) de Levins (LEVINS, 1968; KREBS, 1989) foram calculados para determinar a amplitude de nicho do bagre-guri a partir dos dados dos conteúdos estomacais e auxiliar na interpretação da sua estratégia alimentar (especialista vs. oportunista), conforme as equações abaixo:

$$B = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

$$B_A = \frac{(B - 1)}{(n - 1)}$$

Em que, p_i é a proporção da presa i em relação a todos os itens alimentares; e n é o número de categorias de presas determinadas.

A partir dos componentes responsáveis pela amplitude de nicho total de uma população (*total niche width*; TNW_s), foi calculado o grau de especialização individual baseado no índice de Shannon-Weaver proposto por Roughgarden (1979) a partir da variação no uso de recursos pelos indivíduos (*within-individual component*, WIC_s) e a variação entre os indivíduos (*between-individual componente*, BIC_s). A proporção do nicho total (TNW_s) explicada pelo componente da variação intraindividual (WIC_s/TNW_s) se aproxima de 1 quando todos os indivíduos possuem máxima sobreposição alimentar, enquanto baixos valores indicam alta especialização individual. Os índices foram calculados pelo software IndSpec1 (BOLNICK et al., 2002) a partir de uma matriz elaborada com a área (mm^2) das presas (colunas) ingeridas por cada indivíduo de bagre-guri, categorizadas conforme apresentado no diagrama adaptado de Costello.

2.7 MICROQUÍMICA DE OTÓLITOS

Foram escolhidas três espécies de interesse comercial, abundantes e amplamente distribuídas ao longo da costa do Espírito Santo (rios São Mateus, Ipiranga e Doce) e sul da Bahia (Caravelas). Desta forma, foram selecionadas *Centropomus parallelus* (robalo-peva), *C. undecimalis* (robalo-flecha) e *Genidens genidens* (bagre-guri). as mais abundantes ao longo da campanha de amostragem, e que atendem aos demais pressupostos para escolha. Os exemplares foram coletados utilizando redes de

espera de diversas malhas, operadas por pescadores locais e equipe de campo. Além disso, exemplares também foram obtidos nas peixarias de cada região, certificando-se do local de origem dos mesmos.

Após a coleta, os indivíduos foram medidos (comprimento total – CT, em mm), pesados (PT – g) e dissecados para retirada dos otólitos. No laboratório os otólitos foram limpos em câmara de ultrassom para retirada dos tecidos aderentes. Posteriormente foram emblocados em resina epóxi, cortados transversalmente, lixados e polidos até o plano do núcleo (Figura 8).

Após o processamento, os otólitos foram fixados em lâminas de vidro para posterior análise (Figura 9). As concentrações elementares isotópicas nas seções transversais dos otólitos foram medidas usando um sistema de Ablação a Laser (AL), acoplado a um ICP-MS do Departamento de Petrologia e Metalogenia da UNESP de Rio Claro, SP. As abundâncias dos isótopos ^7Li , ^{24}Mg , ^{44}Ca , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{85}Rb , ^{86}Sr , ^{114}Cd , ^{138}Ba , ^{202}Hg e ^{208}Pb foram determinadas do núcleo até a borda das seções do otólito. As configurações de AL foram: diâmetro do feixe 50 μm , fluência 12 J cm^{-2} , taxa de repetição 10 Hz, velocidade de varredura 10 $\mu\text{m s}^{-1}$ e saída de energia 100% (máximo de 5,6 mJ). O hélio foi usado como gás de arraste na ablação, o qual foi misturado com argônio para injeção no plasma ICP-MS. ^{43}Ca foi utilizado como padrão interno, com uma concentração na matriz do otólito estimada em 36%. O padrão para microanálises de carbonatados, MACS-3 (United States Geological Survey, US) foi analisado ao longo de cada dez otólitos, a fim de calibrar a conversão entre contagens por segundo em concentração elementar em relação a um elemento químico padrão (em ppm) e para corrigir desvios de máquina e viés de massa (WEBB et al., 2012; SIROT et al., 2017). Para evitar qualquer contaminação da superfície, uma pré-ablação de 85 μm foi realizada antes das principais transecções de 50 μm . Todos os dados isotópicos são dados como concentração em relação a ^{43}Ca (elemento:cálcio) x 1000 ppm.

Para avaliação do uso do habitat através da microquímica do otólito, baseado nos perfis das razões Sr:Ca (x1000 ppm) e Ba:Ca (x10000 ppm), elementos estes, indicadores de salinidade (ELSDON et al., 2008), do núcleo até a borda, ambas espécies, foram classificadas de acordo com Potter et al. (2013), em quatro tipos descritos abaixo: Tipo I são referentes a peixes de água doce/estuarino oportunistas, uma vez que nascem no ambiente límnic (elevados valores da razão Ba:Ca e baixos valores da razão Sr:Ca no núcleo do otólito) e permanecem nesse ambiente ao longo da vida, podendo fazer algumas incursões na região estuarina; Tipo II são referentes a peixes exclusivamente estuarinos, ou seja, apresentam razões de Sr:Ca e Ba:Ca intermediárias, típicas desses ambientes; Tipo III são referentes a peixes estuarinos/marinhos, ou seja, apresentam elevados valores de razões Sr:Ca e razões de Ba:Ca extremamente baixos, típicas do ambiente marinho; e Tipo IV são referentes a peixes estuarinos/água doce, ou seja, nascem no ambiente estuarino e podem usar o ambiente de água doce ao longo da vida.

Figura 8: Resumo esquemático das etapas e procedimentos realizados para análises de microquímica de otólitos

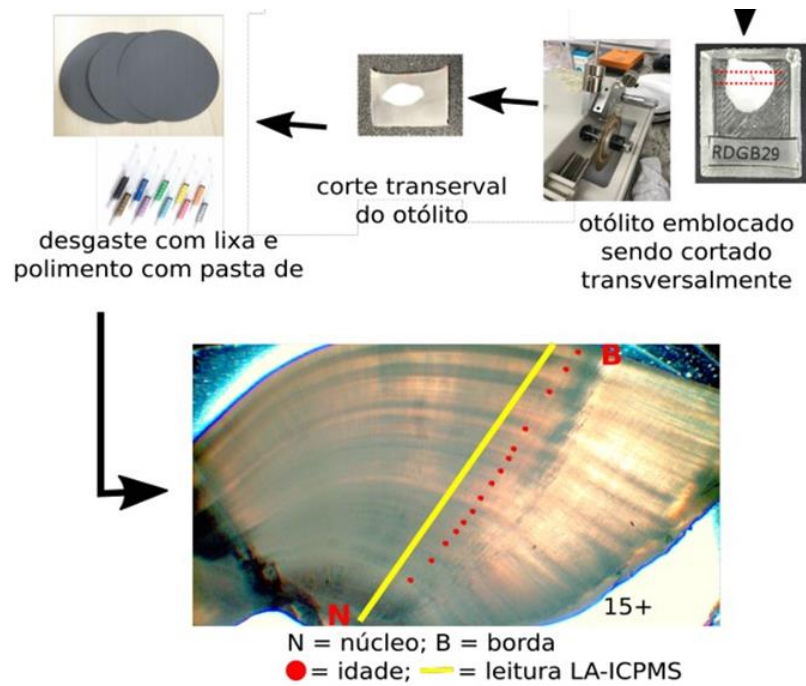
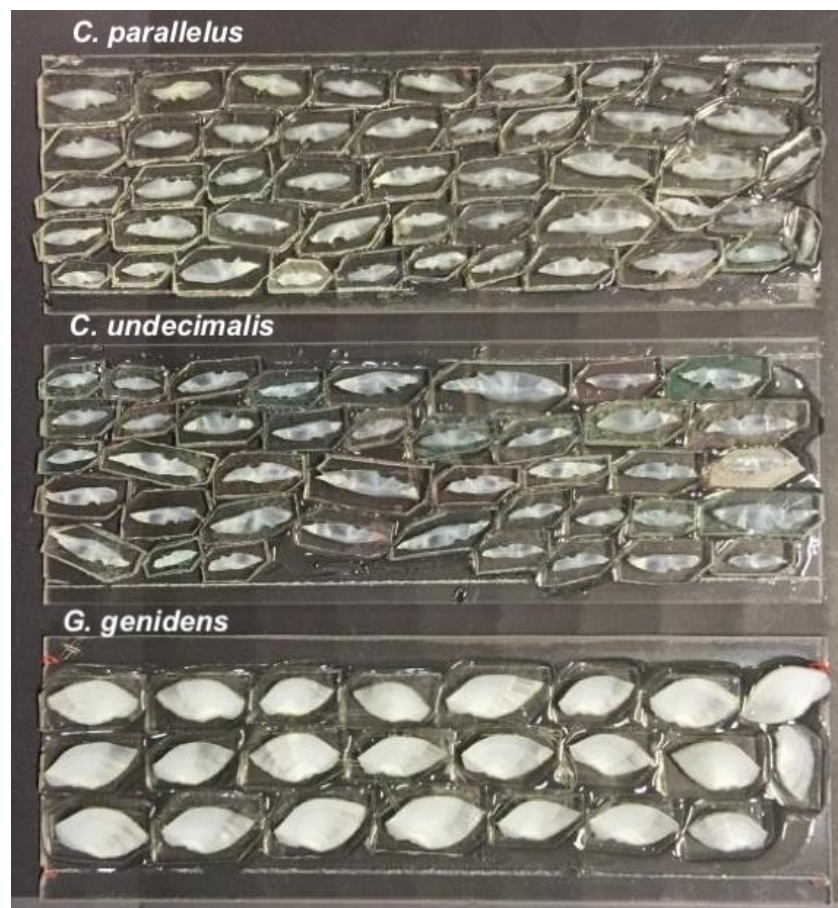


Figura 9: Lâminas de vidro contendo os otólitos para análise no LA-ICP-MS



Para verificar a assinatura química entre os quatro estuários, foram realizadas análises de variância multivariada permutacional (PERMANOVA), aplicada para comparar as assinaturas químicas multi-elementares, dos otólitos entre os locais. Para análises multivariadas, as matrizes de dissimilaridade foram baseadas na distância euclidiana e os valores de P foram gerados usando 999 permutações. O modelo considerado estatisticamente significativo foi seguido por comparações permutacionais parwise entre todos os pares de níveis (ANDERSON, GORLEY, CLARKE, 2008). Os dados foram transformados em log ($x + 1$) e a conectividade entre os locais de coleta foi realizada uma Análise Canônica de Coordenadas Principais entre locais, baseada nas assinaturas químicas do núcleo e da barda para cada espécie, considerando assim a porcentagem de reclassificação. As análises foram realizadas na plataforma R e no software PRIME + PERMANOVA V.6.

2.8 TELEMETRIA ESTUARINA

2.8.1 Área de estudo

O presente estudo foi desenvolvido nas fozes dos Rios Doce e São Mateus e áreas marinhas adjacentes, localizadas no litoral norte do Espírito Santo. As regiões estuarinas destes rios estão localizadas no distrito de Regência, cidade de Linhares (Rio Doce) e na cidade de Conceição da Barra (rio São Mateus) (Figura 10).

Figura 10: Área de estudo no litoral norte do Espírito Santo, Brasil



2.8.2 Coleta de dados Telemetria de peixes estuarinos

Para o estudo de telemetria estuarina foram selecionadas duas espécies de robalos (*Centropomus parallelus* e *C. undecimalis*) em razão da alta importância econômica, social e recreativa destas nas áreas estudadas (RODRIGUES, 2005). Uma vez que os robalos são eurihalinos, ou seja, vivem tanto na água doce quanto salgada (GRACIA-LOPEZ et al., 2006), a compreensão da movimentação entre os ambientes de água doce, estuarino e marinho, é fundamental para a determinação de possíveis impactos causados pelo Rompimento da Barragem de Fundão sobre a dinâmica destas espécies.

O sistema de rastreamento utilizado no estudo de telemetria estuarina é composto por transmissores e receptores da VEMCO®, líder mundial no segmento. No presente estudo foram utilizados dois tipos de transmissores (contínuo e codificado) que emitem sinais acústicos singulares e identificáveis; e seus respectivos receptores (VR100 e VR2W). Em cada um dos rios estudados foi montado um *grid* de detecção com oito receptores VR2W para o monitoramento passivo dos indivíduos marcados, além do monitoramento ativo realizado através da utilização de um hidrofone móvel (VR100).

Exemplares de robalo foram capturados através de métodos não letais para o implante dos transmissores acústicos. Todos os indivíduos foram previamente anestesiados e uma incisão de 20 mm realizada na cavidade celomática para a inserção do transmissor acústico. Após a sutura do corte os indivíduos foram monitorados por cerca de 20 minutos, sendo posteriormente devolvidos ao rio.

As coletas de dados referentes à telemetria ativa ocorreram durante duas campanhas intensivas de 10 dias de rastreamento em cada rio estudado. Totalizando um esforço de campo de 160 horas em cada rio. Para obtenção dos dados de telemetria passiva, os receptores VR2W fundeados foram recuperados através de mergulho autônomo, após aproximadamente um ano. Foram coletados cinco e sete receptores, respectivamente, nos rios Doce e São Mateus. Para maiores detalhes sobre a metodologia de coleta de dados ver Protocolo de Telemetria estuarina.

2.8.3 Análise de dados Telemetria de peixes estuarinos

Para definição da área de vida foi utilizado o método de Densidade de Kernel (KUD) (WORTON, 1989). O método KUD é uma abordagem probabilística que oferece uma densidade de uso em toda a área de estudo. O uso do espaço é frequentemente apresentado como uma distribuição de probabilidades por uma função de distribuição do uso (VAN WINKLE, 1975), que dá a densidade de probabilidades de realocar os indivíduos em qualquer lugar conforme as coordenadas geográficas.

Índices de residência (IR) e fidelidade (IF) foram estimados com o intuito de verificar possíveis diferenças na permanência dos indivíduos dentro das áreas de estudo. O índice de residência foi calculado considerando o número de dias com detecções sobre o número total de dias em liberdade (número de dias entre a soltura e última detecção) para cada indivíduo. O índice de fidelidade foi baseado no número de horas com detecções sobre o número total de horas em liberdade (número de horas entre a soltura e a última detecção) para cada indivíduo.

Os dados registrados nos receptores foram obtidos através do *software* VUE - VEMCO®, sendo posteriormente validados de modo a eliminar das análises possíveis ruídos captados e sinais de fraca intensidade (< 60 dB) (ver CLEMENTS et al., 2005; YOUNG et al., 2016). As análises de distância percorrida e KUD foram realizadas através do website *Zoatrac* (<https://zoatrac.org>) (DWYER, 2015) e do *software* R (R Core Team, 2017), através do pacote *AdeHabitatHR*. As médias de profundidade, distância percorrida, KUD50, KUD95, IR e IF foram comparadas entre os rios Doce e São Mateus através do teste de *Mann-Whitney* com a utilização do *software* Statistica12.

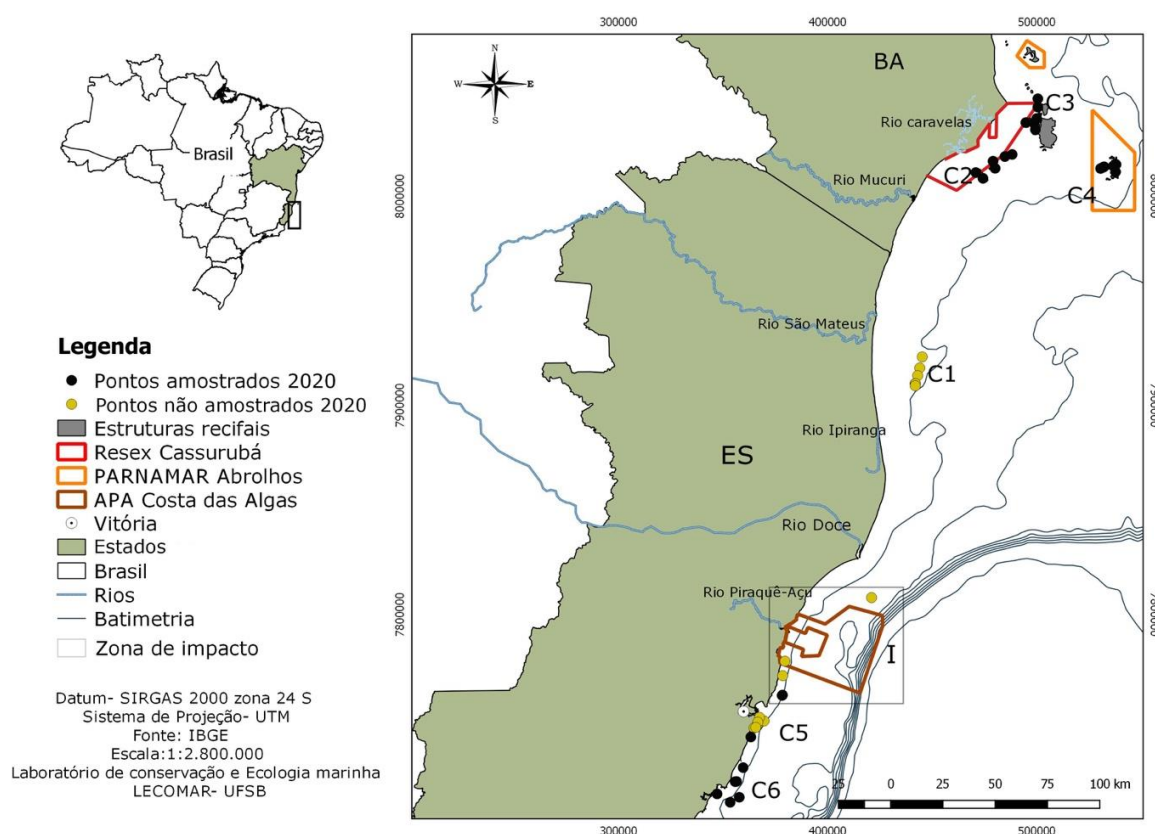
3 PEIXES RECIFAIS

3.1 ASSEMBLEIA DE PEIXES RECIFAIS

3.1.1 Área de estudo

A fim de descrever a estrutura das comunidades de peixes recifais foram estabelecidas seis áreas de controle e uma de impacto: Recife dos Esquecidos (C1), Cassurubá (C2), Paredes (C3), PARNA Abrolhos (C4), Vitória (C5), Guarapari (C6) e APA Costa das Algas (I), respectivamente (Figura 11).

Figura 11: Mapa referente aos pontos de amostragem dos dados coletados na metodologia do censo visual e em fotoquadrado das três campanhas nos períodos de 2019 e 2020. São seis zonas de controle e uma zona de impacto C1 = Recife dos Esquecidos, C2 = Cassurubá, C3 = Paredes, C4 = PARNA Abrolhos, C5 = Vitória, C6 = Guarapari e I = APA Costa das Algas



3.1.2 Coleta de dados

Variáveis ambientais e cobertura bentônica

Em cada ponto fixo realizado para censos visuais (censo ou unidade amostral), os dados ambientais (ver Protocolo para Coleta de Dados com Censo Visual Subaquático e Fotoquadrado) foram tomados para controle da variabilidade espacial entre setores e localidades amostradas. São registradas para cada censo a profundidade e a visibilidade horizontal. Ao finalizar o censo, o mergulhador estima em cada quadrante do cilindro as variáveis de heterogeneidade do habitat (tipo de substrato) e complexidade (arquitetura e verticalidade do substrato).

Para obtenção de dados de cobertura bentônica (% de organismos que recobriam o fundo), foi utilizada a metodologia de fotoquadrado anexadas ao censo visual de peixes. Foram utilizados 2 quadrados feitos de tubo de PVC com as dimensões 80x70 cm. Os quadrados são subdivididos em 15 fotos de 22x15 cm, em que cada subdivisão serviu como referência para as fotografias de fundo (FRANCINI-FILHO, 2008). As imagens foram analisadas no software CPCe (*Coral Point Count with Excel extensions* 4.1) utilizando 30 pontos aleatórios por foto. Após a análise das fotos no CPCe, os dados de porcentagem de cobertura por grupo bentônico foram exportados para uma matriz de Excel. O conjunto de 15 fotos compuseram um fotoquadrado, e a média de cobertura obtida pelos dois fotoquadrados de cada ponto fixo do censo representaram uma unidade amostral.

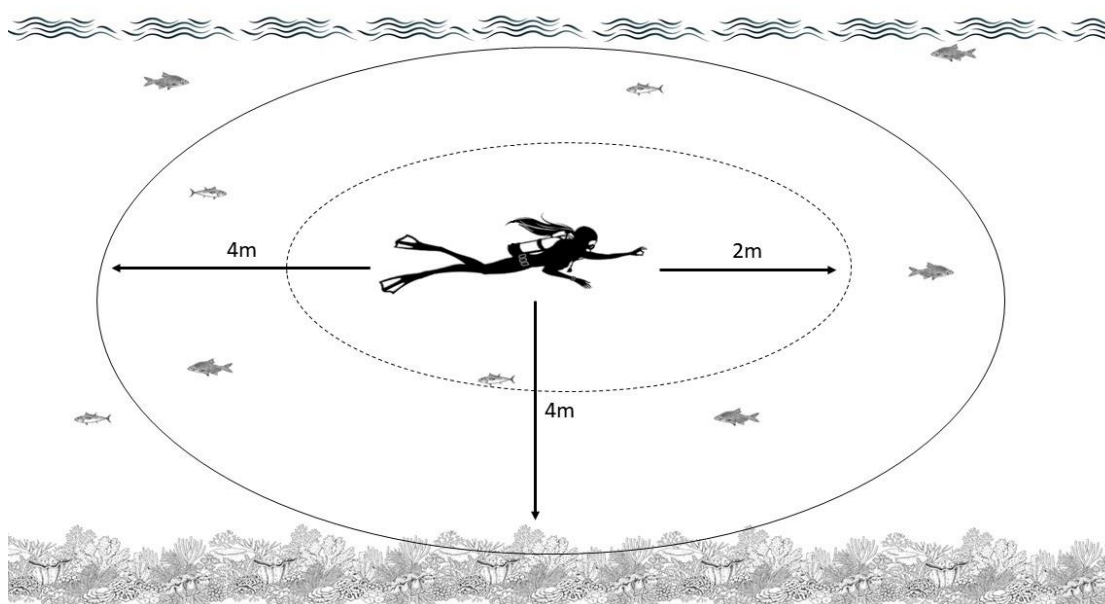
Os organismos bentônicos foram classificados nos seguintes grupos: 1) Macroalgas; 2) Sedimento; 3) Filtradores; 4) Outros invertebrados; 5) Equinodermos; 6) Matriz de algas epilíticas (MAE); 7) Cianobactérias; 8) Alga calcária; 9) Octocorais; 10) Zoantídeo 11) Corais incrustante; 12) Corais massivos e 13) Corais ramificados.

Peixes recifais

Seguindo o desenho de impacto *beyond BACI* proposto por Underwood (1992), onde não há dados prévios ao impacto resultando em uma comparação ACI, estabelecemos múltiplos controles (n=6) a serem contrastados com a zona impacto (n=1). Em cada uma das sete zonas de estudo (C1=Recifes Esquecidos, C2= Cassurubá, C3=Paredes, C4=Abrolhos, C5=Vitória, C6=Guarapari e I=APA Costa das Algas) foram selecionados seis setores aleatórios. As zonas amostrais C5 e C6 foram inseridas no período de transição no intuito de ampliar as zonas Controle ao sul do Rio Doce, e ampliar a variabilidade de ambientes avaliada. Em cada setor são realizados seis pontos fixos, sendo que cada um possui um raio de quatro metros, para peixes >20cm, e um raio de dois metros para peixes <20cm, adaptado de Minte-Vera et al. (2008). Para realizar um censo uma trena é estendida sobre o fundo para auxiliar na delimitação do raio amostral que determina o volume do cilindro imaginário onde é realizada a identificação das espécies de peixes por um tempo total de cinco minutos (Figura 12). Em seguida são anotadas as abundâncias das espécies identificadas. O tamanho dos peixes é estimado em classes de dois em dois centímetros. Estas medidas diminuem o erro amostral e, portanto, aumentam a acurácia dos dados coletados (Ver Protocolo para Coleta de Dados com Censo Visual Subaquático e Fotoquadrado para mais detalhes).

Para a realização dos 36 pontos fixos em cada zona necessita-se de aproximadamente três a cinco dias embarcados (correspondente a uma campanha), a depender da quantidade de mergulhadores e das condições de navegação.

Figura 12: A metodologia de censo visual de comunidade de peixe recifal. Um mergulhador se posiciona no meio de um cilindro de quatro m de raio, marcado com uma trena, e anota todos os peixes que passa dentro do cilindro durante cinco min. Indivíduos menores do que 20cm são observados com um raio de dois metros para evitar subestimação devido visibilidade limitada



3.1.3 Análise de dados

Variáveis ambientais

As matrizes de dados foram organizadas segundo Tempo (Campanha 1-3), Zona (sete níveis), Setor (seis níveis) e Amostra (seis amostras). Campanha 1 (T1) foi realizada janeiro – março 2019, campanha 2 (T2) durante junho – agosto 2019 e campanha 3 (T3) durante janeiro – março 2020.

As variáveis ambientais foram avaliadas quanto à existência de autocorrelação através do software R, com o pacote estatístico '*Performance Analytics*', e suprimidas das análises posteriores quando correlacionadas (apresentando valores maiores do que 0.70). Com as variáveis restantes foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com a finalidade de avaliar o grau de similaridade entre as amostras obtidas em função das variáveis ambientais através do pacote '*vegan*' (OKSANEN et al., 2019). Adicionalmente gráficos box-plots foram utilizados para ilustrar a flutuação dos parâmetros ambientais coletados em função do espaço e/ou tempo amostrado.

Assembleias de peixes recifais

A biomassa dos indivíduos de peixes foi calculada causando as constantes a e b , obtidas no FishBase (FROESE & PAULY, 2019). Para caracterizar as comunidades de peixe em cada zona em termos de grupos tróficos, cada espécie foi classificada dentro de um dos seguintes grupos tróficos: Piscívoro-cephalopoda (PC), Herbívoro-detritívoro (HD), Herbívoro móvel (HM), Invertebrados sésseis (IS), Invertebrados móveis (IM), Onívoro (ONI) ou Planctívoro (PL) seguindo também a classificação do FishBase (FROESE & PAULY, 2019).

Para comparar a composição, abundância, riqueza, diversidade de Shannon-Wiener, biomassa, tamanho médio das espécies e índices de diversidade α de peixes recifais entre os fatores Zona e Setor, foi utilizado Análise de Variância por Permutação (PERMANOVA) de forma multivariada (composição de espécies) e univariada (demais variáveis), através do índice de similaridade de Bray-Curtis. Segundo o desenho amostral, foi realizado o contraste (I vs C), onde a variância da Zona Impacto foi comparada com a variância obtida entre todas as Zonas Controles. Para avaliar quais médias eram significantes entre si o teste *pair-wise* foi utilizado quando os resultados da PERMANOVA eram significativos. Gráficos box-plots foram utilizados para visualizar as médias significativamente diferentes (incluindo o erro padrão como medida de dispersão). As variáveis ambientais obtidas em cada réplica: cobertura de organismos bentônicos, % de substrato (cascalho e recife), temperatura, rugosidade e inclinação do fundo e profundidade foram incluídas como co-variáveis dos dados de abundância, composição e biomassa de peixes nos testes estatísticos realizados (PERMANOVA).

Devido as diferenças de malha amostral entre os anos de 2019 e 2020, e que devido a pandemia as amostragens de 2020 estão incompletas, o fator “Tempo” não foi incluído como um fator fixo e a zona C5 foi excluída das análises.

Adicionalmente diferenças em abundância e biomassa dos grupos tróficos entre as zonas e setores amostrados foram testados com PERMANOVA. As análises de PERMANOVA foram realizadas utilizando o software Primer v.6.1.15 com a extensão da PERMANOVA v.1.0.5, utilizando 9999 permutações e o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Para visualizar a similaridade de composição e abundância da ictiofauna entre as amostras obtidas em um espaço bidimensional, foi utilizado o Diagrama de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), também utilizando índice de similaridade de Bray-Curtis através do software R (versão 4.0.0) através do pacote ‘vegan’ (OKSANEN et al., 2019). Os dados foram standardizados com o ‘vegdist’.

Com o fim de avaliar a eficiência das amostragens realizadas em cada estudo realizado, a riqueza observada nos dados de censos visuais de cada zona foi comparada com estimadores CHAO 1 E 2, JACKKNIFE 1 e 2 e *Bootstrap* usando o software Primer v.6.1.15. Adicionalmente, foram plotados os índices de diversidade local (α), regional (γ) e entre habitats (β) com a finalidade de comparar a riqueza de espécies de peixes recifais entre as zonas estudadas.

Buscando aprofundar o efeito do impacto sobre a diversidade das comunidades, aplicamos um índice de diversidade verdadeira (sensu JONES, 2006, 2007) considerando que o número efetivo de espécies é equivalente ao número de Hill (qD) (HILL, 1973) onde, a diversidade poder ser quantificada como espécies igualmente abundantes, com base no aumento do peso da abundância pela ordem de diversidade q . Quando q igual a 0 (0D) as abundâncias são desconsideradas, o que favorece a representatividade de espécies raras; quando q é igual a 1 (1D) o valor de diversidade gerado equivale a entropia de Shannon e espécies comuns na comunidade têm representação mais efetiva; e quando q é igual a 2 (2D) um peso desproporcional é dado para abundância e as espécies dominantes são mais representativas (JOST, 2007). Os índices foram calculados no software R (versão 4.0.0) através o pacote 'entropart' (HÉRAULT, 2015).

Para entender quais fatores ambientais influenciam a composição de espécies, uma Análise de Redundância (RDA) foi feita, usando as variáveis ambientais como preditores e a assembleia de peixes como variável resposta. A distância para o Rio Doce foi incluída como um *proxy* do fator impacto. Os dados ambientais foram estandarizados, através do pacote 'vegan', com o fim de permanecerem em uma mesma escala. Os dados de abundância da ictiofauna foram transformados usando a transformação de Hellinger para diminuir a influência dos zeros (LEGENDRE & GALLAGHER, 2001). A significância dos eixos foi testada com a função 'anova.cca', e apenas foram mantidas as variáveis significativas que não tiveram autocorrelação.

Para oito espécies foram avaliados os padrões populacionais de ocorrência e distribuição entre as zonas amostradas, sempre considerando o mesmo desenho amostral proposto (*beyond-BACI*). As espécies foram selecionadas por apresentarem alto grau de relevância ecológica e ou econômica, e por estarem listadas sob algum grau de ameaça segundo a lista da IUCN e/ou lista nacional de espécies ameaçadas.

3.2 TELEMETRIA DE PEIXES RECIFAIS

3.2.1 Marcação

Os estudos envolvendo telemetria foram realizados seguindo metodologia proposta por Hackradt (2012). A espécie *Mycteroperca bonaci*, badejo-quadrado, foi escolhida para a realização do estudo de movimentação e comportamento devido a sua importância econômica e ecológica (predador), podendo atuar como um bioindicador de impacto ambiental (KOCK, 2011). O *Mycteroperca bonaci* (Figura 13A) foi selecionado para o estudo de telemetria de peixes recifais por ser uma espécie de alto valor econômico e alta relevância no ecossistema (FREITAS, 2014; PREVIEIRO, 2018). Ao ser um organismo predador de topo de cadeia alimentar (FREITAS, 2014) o badejo-quadrado (*M. bonaci*), atua controlando as populações de suas presas através de um sistema *top-down* (BOADEN & KINGSFORD, 2015).

Para o monitoramento dos *tags* codificados (emitem um *ping* a cada 30 segundos) se é necessário determinar o alcance dos hidrofones móveis (VR100), através da condução de uma prova de intervalo

de detecção. Com base neste estudo prévio, foi elaborado um plano de amostragem móvel a ser realizado com o VR100. A área de estudo e sua área de entorno foram monitoradas periodicamente através do uso de hidrofone, direcional (VH110), utilizado a partir da embarcação de monitoramento. Associado ao hidrofone móvel foi acoplado uma rede de hidrofones fixos (VR2W) (Figura 14). Os animais, ao se moverem dentro da rede de hidrofones, foram sequencialmente detectados pelos mesmos dentro de sua área de detecção.

Figura 13: Coleta de dados das atividades de telemetria de peixes recifais; A) Badejo quadrado, *Mycteroperca bonaci*, espécie-alvo do estudo de movimentação, B) covos utilizados na captura dos espécimes, C) esvaziamento da bexiga natatória previamente a cirurgia, D) incisão para implantação do *tag* acústico, E) soltura e acompanhamento do animal marcado com uma *tag* externa identificadora



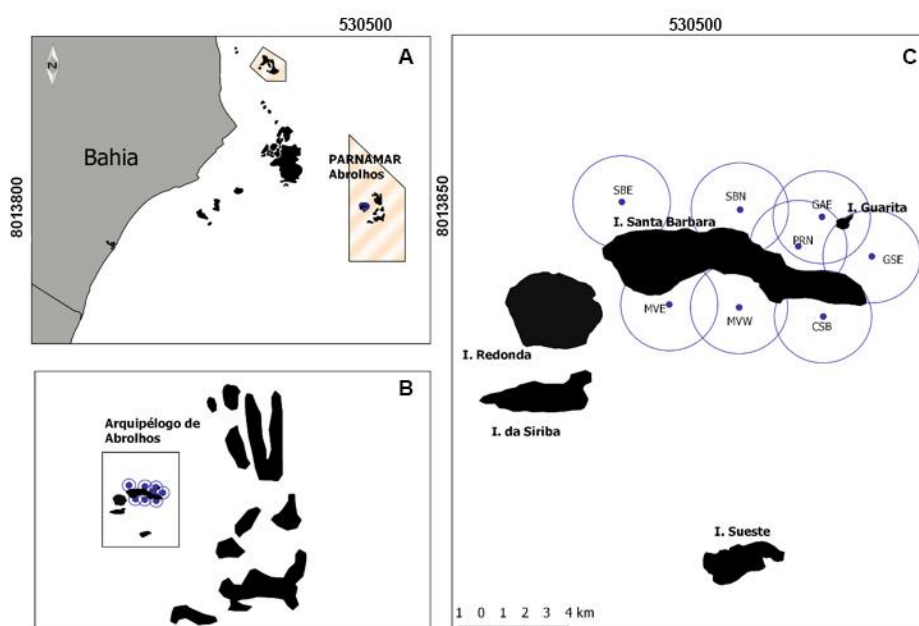
Para captura dos peixes, foram utilizados covos, puçás e anestésicos para a captura de espécies que se refugiam em covas e grutas. Após capturados, os peixes foram levados ao barco e colocados em um tanque contendo água do local, e tiveram suas bexigas natatórias totalmente esvaziadas com o auxílio de uma agulha hipodérmica de 18 polegadas. Todos os peixes capturados foram pesados e mensurados (CT em mm). O *tag* codificado esterilizado com iodo foi inserido na cavidade peritoneal e em seguida a fechada e limpa a incisão. Implantou-se uma marca externa em cada peixe capturado (*tag*), onde cada etiqueta tem um código numérico que permitiu a identificação e o acompanhamento do animal e uma cor distinta para cada local de amostragem. Essa cor permitiu identificar os movimentos dos peixes do local onde foram marcados para diferentes locais (Figura 13E). Aplicou-se antisséptico no local da inserção da etiqueta para evitar possíveis infecções.

Após a captura, os peixes foram acomodados em uma cama cirúrgica e receberam uma pequena incisão de 10 a 20 mm de comprimento entre as nadadeiras peitorais, sendo inserido o transmissor codificado acústico (15 indivíduos foram marcados com *tags* codificados), posteriormente fechada a

incisão com cola cirúrgica, além de ser aplicado antisséptico. Os animais foram mantidos no tanque com água do mar e oxigenado com auxílio de um aerador antes de serem liberados para que seja assegurado que estão em boas condições. Mergulhadores acompanharam os peixes até o local em que foram capturados.

A manutenção dos receptores e leitura dos dados foram realizados trimestralmente sendo a última descarga ocorrida em março de 2020, sendo impossibilitado novas leituras e manutenção dos receptores devido a paralisação das atividades de campo decorrente da pandemia e necessidade de isolamento social. O monitoramento ativo dos animais, a partir do uso do VR100 foi realizado em novembro de 2019 com nove dias de campo.

Figura 14: Mapa da malha de detecção de hidrofones fixos (VR2W) no PARNA de Abrolhos. A) Mapa da localização da área de estudo, indicando a localização do PARNA Abrolhos; B) Indicação do Arquipélago de Abrolhos (onde o estudo está sendo realizado) e o parcel dos Abrolhos em seu entorno e C) localização da malha de detecção formada pelos receptores VR2W no entorno da Ilha de Santa Bárbara - Arquipélago de Abrolhos (Os pontos indicam localização do VR2W e os círculos a área de detecção calculada - 300m - para cada hidrofone).



O rastreamento foi feito utilizando-se um hidrofone direcional (VH110) acoplado a um localizador receptor sistema VR100 (VEMCO®). Foram feitos transectos de 10 minutos em cada local de marcação. Quando nenhum peixe era detectado, outro local foi visitado. Quando houve sinal positivo, o barco era posicionado para adquirir o sinal mais forte possível a partir do transmissor e seguir o sinal detectável. Quando o sinal era perdido, continuou-se o transecto até os 10 minutos estarem completos. Quando um novo sinal era detectado pelo receptor móvel, se prosseguia para completar o rastreamento com este novo peixe. O rastreamento foi feito até que o sinal do animal fosse perdido, atingindo o máximo de 45 minutos em um único local. Os peixes etiquetados foram monitorados através de censos visuais subaquáticos realizados em cada local de marcação.

3.2.2 Análise de dados

Dados do VR2W foram descarregados com auxílio do *software* VUE (Vemco®) e introduzidos em uma matriz de dados do Excel. Falsas detecções foram eliminadas previamente ao início das análises. A taxa de residência total e por receptor foi calculada através da razão do número de dias em que o animal foi registrado em um determinado receptor (IR_i) ou no *grid* de detecção (IR_T) pelo número total de dias de monitoramento. Os dados registrados nos receptores foram obtidos através do *software* VUE - VEMCO®, sendo posteriormente validados de modo a eliminar das análises possíveis ruídos captados e sinais de fraca intensidade (< 60 dB) (CLEMENTS et al. 2005; YOUNG et al. 2016). As análises de distância percorrida e MPC foram realizadas através do *software* R (R Core Team, 2017), através do pacote AdeHabitatHR (CALENGE, 2019).

Para análise dos dados depois de seleção e remoção de detecções falsas, sem posição de GPS, foi estimado o Polígono Convexo Máximo (MCP) que indica toda a área utilizada por um indivíduo.

Adicionalmente, uma estimativa de Área de Vida Linear (*Home range* linear) foi usada como *proxy* da dispersão horizontal dos indivíduos, e dada em metros. Com a finalidade de avaliar se indivíduos maiores possuíam maior potencial de dispersão, uma regressão linear entre o *home range* linear e o tamanho dos indivíduos foi realizada.

4 GENÉTICA

4.1 GENÉTICA POPULACIONAL DE PEIXES ESTUARINOS/MARINHOS E RECIFAIS

Foram selecionadas oito espécies de peixes estuarinos para estudos populacionais utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares. Concomitantemente as coletas da ictiofauna estuarina, realizada pela equipe do CEUNES – UFES, um número mínimo de 30 indivíduos de cada espécie foi amostrado em cada estuário visitado (ver Protocolo Genética de Populações), dos quais uma amostra de tecido de 5 cm² oriundo da nadadeira caudal ou anal foi recolhida e acondicionada em um microtubo com álcool 100% pela equipe do Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES-UFES, em São Mateus-ES e conduzida até o laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFSB, em Porto Seguro-BA. Todas as amostras se encontram acondicionadas em freezer -80°C no referido laboratório.

A extração de DNA de todos os organismos coletados foi realizada seguindo o protocolo modificado de solução salina (BRUFORD et al., 1992.) para peixes recifais e através de kits de extração (PureLink™ *Genomic DNA Kit* - Invitrogen, ThermoFisher Scientific™) para peixes estuarinos. Após a extração, a concentração de DNA foi avaliada no equipamento *Qubit Fluorometric Quantitation* (ThermoFisher Scientific™).

A estratégia de investigação dos genomas visa obter polimorfismos que permitam a análise refinada dos processos microevolutivos. Foram utilizados dois marcadores de alto nível de polimorfismo, custo

médio para desenvolvimento, alta resolução, análise automatizada e disponibilidade de aplicativos computacionais para análise estatística – “Dloop” e Microsatélites.

4.1.1 Extração de DNA, amplificação e sequenciamento/genotipagem

A amplificação parcial dos segmentos de DNA da região controladora (D-loop) com cerca de 1000 pb, foi efetuada utilizando foram utilizados iniciadores descritos como universais para peixes (Quadro 2)

Quadro 2: Iniciadores (*primers*) utilizados na otimização das reações de amplificação para a região controle do gene mitocondrial (Dloop), com as sequências correspondentes e autores

ID <i>primer</i>	Sequência	Autor
Marfish_Thr_F	5'-AGCACCGGTCTTGTAACCG-3'	Cheng et al. (2012)
Marfish_Phe_R	5'-GGGCTCATCTTAACATCTTCA-3'	Cheng et al. (2012)
SBL1	5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGKATTC -3	Santa Brígida et al. (2007)
SBH1	5'-TGTTTATCACTGCTGRRTTCCCT -3'	Santa Brígida et al. (2007)
Dloop A _F	5'-TCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG-3'	Lee et al. (1995)
Perc 12S 1R	5'-GCGGATACTTGCATGTGTAA -3'	Santa Brígida et al. (2007)

Para marcadores microsatélites, seis das quinze espécies utilizadas neste estudo não possuem marcadores moleculares microsatélites descritos na literatura, desta forma, 12 novos locus para cada uma das 6 espécies, foram prospectados pela empresa Allgenetics (Espanha), durante o período de transição (outubro/2019 e março/2020), e foram incorporados ao trabalho de caracterização genética, trazendo assim resultados inéditos a respeito da diversidade genética na região. Todos os loci usados nas amplificações para esse trabalho encontram-se descritos no Quadro 3 e Quadro 4.

Quadro 3: Marcadores microsatélites das espécies recifais que se encontram descritos na literatura

Espécie	Referência	Nº locos
<i>Mycteroperca venenosa</i> .	RENSHAW et al. (2011)	10 locos
<i>Lutjanus synagris</i> .	RENSHAW et al. (2007)	10 locos
<i>Epinephelus morio</i> .	SEYOUM et al. (2016)	10 locos
<i>Mycteroperca bonaci</i>	ZATCOFF et al., 2002	5 locos
<i>Lutjanus analis</i>	SHULZITSKI et al. (2009), RENSCHAW et al. (2007)	10 locos
<i>Ocyurus chrysurus</i>	RENSHAW et al. (2007)	8 locos
<i>Cephalopholis fulva</i> .	RENSHAW et al., 2010	9 locos

Quadro 4 :Marcadores microsatélites de seis espécies de peixes que se encontram descritos na literatura prospectados pelo laboratório *Allgenetics* (Espanha), durante o período de transição (outubro/2019 e março/2020)

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
<i>Conodon nobilis</i>						
1	AG Cno 465	AG	95	CACAGCCAAAGCCCCTTCC	GAGAGAGTGTGCTTGGGACA	FAM
	AG Cno 064	AC	197	CGGCTTCTCTTTGGAATCAG	CGGTCAGTAAGGGATATCAGC	FAM
	AG Cno 474	AC	92	TGGACTCCTCTTTGTATTGTGC	CTCCACACCCATCGTCAGA	HEX
2	AG Cno 436	AG	126	TCTTTCTTCAGAGAGCTGGGTT	AACTCGCAGGAGGTAAAGCA	FAM
	AG Cno 353	AC	99	AGAAGTCACAGAAGGCCAGC	TGATGCAGAGCTTTACACGG	NED
3	AG Cno 110	AC	110	GACGAAATCGTGACATTCCC	CACATCTCAGTGTGTGCTGC	FAM
	AG Cno 373	AG	241	TGACATGCTTAGATGAGCCCT	CAACAGGATACGTCTGCGTC	HEX
	AG Cno 014	AC	97	AATTCTTGGCAGTTGGATGG	CGCTCATTCATCTGTCTTTGTC	NED
4	AG Cno 275	AG	123	TGGATCTCAATAGGCTTCGG	TATTTATCACATCGCCTCCC	FAM
5	AG Cno 288	AC	127	CTCTCAGAGACGCGCACA	ACCTCACACCTGTAGCACCC	FAM
6	AG Cno 252	AC	90	CTGAGGTGTCACTCTCGCTC	ACAGTCTGAGAAGTTAGTTTGGACA	FAM
	AG Cno 164	AC	92	TAGCCAATCGCACCCCTAGTC	CGTGCTTTATTATTCCTGTCCTG	NED
<i>Isopisthus parvipinnis</i>						
1	AG Ipa 150	AC	92	GTGCATATGAGGGTGACAT	GGGTATTTATGTGAGGTGGAAGA	FAM
	AG Ipa 001	AC	94	TTCTCCAGCTCCACCTCTCT	CAAAGTGCAGTGGTCTCCTG	HEX
	AG Ipa 134	AC	107	TGTACCGTAAGCAACATCCG	TGTCTCAAACGTGATCACACC	NED
2	AG Ipa 076	AC	114	GAACTCAGCTTTGTACGGTGAA	AAATGGGCCAGTGGTTGTAT	FAM

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
	AG Ipa 357	AC	110	TTCCGTCTCCACTAACTGGG	TGCGTGGAGTTTATCTCTGG	HEX
	AG Ipa 492	AG	92	GGAGAGAAGGAGAAAGAAGGG	GTGGTGCCTAGCCAGCTATC	NED
3	AG Ipa 214	AC	190	CAGTAATCTGAAGTCAGTGAGCA	ATTAGGACTGACCTCCATCACTC	FAM
	AG Ipa 187	AC	294	TCCAGTGCCAGGAGAAGTAA	TCTCCTCCTTTATGGCTTGTTT	FAM
	AG Ipa 406	AC	149	ATCCTCACCTTGCCAGGAC	GTTTGGACTGCTCCTGCTG	HEX
	AG Ipa 387	AG	249	CGCAAGGTCTGTTTGCTAGA	CGGGATCTTGACTGGACATC	HEX
4	AG Ipa 139	AC	95	GCGTTTGCCTACCTAAAGCA	TCATTCTGAGCAGATGGTCG	FAM
	AG Ipa 478	AC	140	ATCCTTAACGTGTGTAGCAAAT	ATAATCTTTGACATCACTTTTCATGACT	HEX
<i>Larimus breviceps</i>						
1	AG Lbr 175	AC	159	GCCACCAGGAAGTTGACATT	CCGCCTAACTGAAGGATCAC	FAM
	AG Lbr 092	AC	277	TGTCAGCTGTCTGAACCGTC	GCAAACCCATCTCCACATTT	FAM
	AG Lbr 345	AC	149	CATACTTTGCCAACGGAGGT	CAGGTGAATCTCATACCCGC	NED
2	AG Lbr 195	AC	104	TGTGCTCACACTTCCTCTGG	CCACAGTCTCCCACTCATCA	FAM
	AG Lbr 060	AC	128	CCTCTCGGCTAAGGCTCTTT	TTATGCAATTGGTCTGGCAA	HEX
	AG Lbr 443	AC	115	CTAGCATCATGGACAGCGAC	GCGACAGTCAGCAGGACATA	NED
3	AG Lbr 301	AG	154	TTGAAGGTCAGGAAGACGCT	CTCAACATCCCACAGTGCAT	FAM
	AG Lbr 076	AG	176	GGTCTCACTCTCAGGGTTGC	ACTACGACTCCCATGATGCC	HEX
	AG Lbr 332	AC	98	GCTGCAGTGACCAATGTCTG	CAGCGGCTAATAAAGCGAAC	NED
	AG Lbr 499	AAC	107	GCAGCATGCTATATTCCGCT	CTGCTTCGCTCCTCTGAAAT	FAM
4	AG Lbr 331	AG	210	CAGCCGTCAACCAGACAATA	GAGTGGCATTGATTGCTGAA	FAM

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
	AG Lbr 372	AG	91	TTCTGAATGGTGGCAAACCTG	GCTTTCAACAGGCCCTCATA	HEX
<i>Pellona harroweri</i>						
1	AG Pha 427	AC	137	TGGTCTTTGAACCTGCCAAT	CTCACAAAGGAACATGCAGC	FAM
	AG Pha 205	AC	112	ACACTCAAAGAAGTGCCGCT	TGGCTGGTCTGGTGGTAGAT	HEX
	AG Pha 047	AC	111	AGTTTAGGTGTGCCTGGGTG	CAGCCTTGGTTAGCTGCTCT	NED
2	AG Pha 097	AG	130	GGGATAAGGGAGTGGAGAGG	TGTTTCACTTGACTCCCACG	NED
	AG Pha 268	AC	249	CTTTGTGGGCAGAGTCTCGT	GTGGCCATGCAGTCAACTAA	NED
3	AG Pha 215	AC	137	AGAGGCACGTCTGCAATCTC	CCTATTGATTCACGGTGGCT	FAM
	AG Pha 050	AAAC	146	CTTTGGGCATTTAGCCATGT	CCTTGAGGGTGACCAATGAT	HEX
	AG Pha 353	AC	291	GGAGGAAGACCAGGTGTGAA	TTTGGGTGCTGTGTAAACCC	HEX
	AG Pha 122	AC	97	CTCTGCCTTCCTGCTCTTTG	GGCTGTAGGCACCACAGTTT	NED
4	AG Pha 300	AC	105	TCAGGCCTACTCATGCCATT	GATGCTTCCTCGGTGTTAGC	FAM
	AG Pha 365	AC	153	GAGAACATGGAGCCAAGCAT	GCGCAACATGTCAGTAGGTC	HEX
	AG Pha 231	AAC	109	TGGGTGGTCTAGCCCATTAG	CCTCAGATTCAGGAGGCAGT	NED
<i>Trinectes paulistanus</i>						
1	AG Tpa 317	AC	114	ACAGTGTGGATCTGCCTCCT	CCCACCTCATTCACTTGCTT	FAM
	AG Tpa 402	AG	171	CACCAAGGACAGGAAGTGCT	TTTGGGAGCTTGTCACCTCT	HEX
	AG Tpa 421	AG	132	TCAAGCACGTAGCACGAGAC	TTCCTGATGGGATTACTGGG	NED
2	AG Tpa 035	AAC	121	ACCTTCATCACCTGGTCAGC	GCACGAGTTCAATCAGCAAA	FAM

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
	AG Tpa 458	AC	92	ATGAGCTGCCTCTGTCTCGT	TGAGAACCACAACCTCCATCG	HEX
	AG Tpa 231	AC	152	GGCCTACAGTAACGGCAGAG	GTGTGCCAGGAAAGGAAGAA	NED
3	AG Tpa 168	AG	169	TCACCCTCCTCTGCCACTAC	ATCCACAGGAACTGTTTGC	HEX
	AG Tpa 251	AAC	101	TTGCCCTTGAAACAACATCA	CATTAAAGCGTCGCCAACT	NED
4	AG Tpa 472	AC	154	TTGTGGGTAATTTGGGCTGT	TACTGAGCAGCAGTGGAGGA	FAM
	AG Tpa 331	ATC	159	GTTTGTGTCGTTTGTGCGTC	TTGTGTTGTACACCCTGCT	HEX
5	AG Tpa 144	AC	120	TTCGCTCTGCACAGACAGTT	ACCAGGGAGCGAAATTAGGT	HEX
	AG Tpa 395	AC	172	GACGAGGCGTTGTGTAGTGA	TTGGTCGTGAGGTTTGAAT	NED
<i>Mycteroperca interstitialis</i>						
1	AG Min 436	AAC	96	CATAGAACAGAAGCCATGCAA	CCCAGTATGTCACAGCATGTC	FAM
	AG Min 047	AC	134	CCAATCTGCAGCCCATAACT	TTGGTTCGTGGACATTTGTT	HEX
	AG Min 287	AC	98	GACCACAGAACCACATTCACC	TGTATGGTAACCTCGGCCAC	NED
2	AG Min 360	AC	100	TCACCTTCCTCTGTGTGCCT	ACAAGCTCCACCGATCAAAT	FAM
	AG Min 082	AC	148	GCAGCCTAGGATTCAGTTCC	AGGAAGGCAGACTGAAAGGG	HEX
	AG Min 289	AC	91	GGGTTACTCTCACCCCTAAATAAA	CTGTAGCGAGCTGGTCATTG	NED
	AG Min 019	AATG	192	GATAGTCTGGCGACCTGTCC	GAGGTAACATGTGCGCTGAA	NED
3	AG Min 497	AC	161	TATCAAACCTCGTTAGGCCGC	TTGTCGCCACTCTTTCTTGA	FAM
	AG Min 276	AC	90	TCTTTATAAGGTCACCTGAGTATCAGA	ATCAGCACCTGCATGCCT	NED
4	AG Min 341	AC	91	TGCTCCTCTGTCAGTGTTGG	GCGCTTGAGACAGTCAGTTCT	FAM

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
	AG Min 344	AC	191	TCCTTGGTGGCTGGCTGT	CCCGCTTTGGACTGAAAGT	FAM
	AG Min 206	AC	95	CCATCTGTTAGTGTGCAGGC	TGTCTCAGTTGTGTGTGCCG	NED

4.1.2 Análises das sequências

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas e editadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999). A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento. A identidade das sequências foi confirmada utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) no NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Todas as amostras foram alinhadas entre si gerando um arquivo que foi utilizado na realização de testes estatísticos posteriores. Para a determinação do número de haplótipos e de sítios segregantes (S), frequência e diversidade de haplótipos, assim como valores de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (Hd), foi utilizado o programa *DNAsp Sequence Polymorphism* (ROZAS et al., 2003).

A matriz de distância genética, a distância genética entre filogrupos e a árvore de haplótipos foram obtidas utilizando o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). A rede de haplótipos foi criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo *Median-Joining* utilizando o programa Popart (LEIGH & BRYANT, 2015).

O coeficiente FST mede a razão entre a deriva genética e o fluxo gênico e o modo como esta razão influencia a estrutura populacional quando se consideram os processos, sendo uma das medidas de estrutura populacional mais utilizadas na genética evolutiva. (TEMPLETON, 2011). Os cálculos do FST foram feitos com a aplicação do programa Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2005).

Para avaliar a neutralidade do processo de seleção natural foram usados os testes de F_s de F_u e D de Tajima executados no programa DnaSP. Se o resultado destes testes indicarem não significativos podemos dizer que as populações estão em equilíbrio genético. Estes testes de neutralidade também foram usados como indicadores de recente expansão populacional quando a hipótese nula de neutralidade for rejeitada devido a valores negativos significativos ($p < 0,05$). Para estimar os valores F e D de F_u e L_i que são testes de neutralidade mais sensíveis aos eventos de seleção foi utilizado o software Arlequin 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

4.1.3 Análise de genotipagem

A determinação do tamanho dos alelos foi realizada utilizando-se o programa GeneMarker v.1.6 (Soft Genetics LLC), através da comparação com o marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX Size Standard (Thermo Fisher Scientific).

A variabilidade genética das populações foi determinada utilizando-se programas computacionais como FSTAT v.1.2 (GOUDET, 1995), Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2005), Structure.2.2 (PRITCHARD, 2000), *Bottleneck* (PIRY et al., 1999). Os tamanhos dos alelos foram organizados em matrizes de dados que foram submetidas aos programas computacionais. Foram calculados parâmetros que permitiram a determinação da diversidade genética intra e interpopulacional.

O número de alelos por loco e a riqueza alélica foram calculados utilizando-se o Fstat v.1.2 (GOUDET, 1995). Os índices de diversidade foram mensurados a partir da heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) e número de alelos por loco (A), sendo todos os testes realizados utilizando os pacotes do programa Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2005). Este programa também foi utilizado para calcular o equilíbrio de *Hardy Weinberg*.

O coeficiente FST mede a razão entre a deriva genética e o fluxo gênico e o modo como esta razão influencia a estrutura populacional quando se consideram os processos, sendo uma das medidas de estrutura populacional mais utilizadas na genética evolutiva. (TEMPLETON, 2011). Os cálculos do FST foram feitos com a aplicação do programa Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2005).

O programa *STRUCTURE* 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000; FALUSH et al., 2003; PRITCHARD & WEN, 2004) foi utilizado para avaliar a possível existência de subdivisão da população. Foram conduzidas 10 corridas independentes para cada valor de K , a partir de 20000 gerações MCMC, seguidos de um *burn-in* de 10000.

O software *Bottleneck* 1.2.02 (PIRY et al., 1999) foi utilizado para detectar reduções populacionais (*bottleneck* ou efeito gargalo) recentes nas populações de cada espécie estuarina e recifal. O programa visa testar a ocorrência de excesso de heterozigosidade nas populações quando a heterozigosidade esperada no equilíbrio de hardy-weinberg é maior que heterozigosidade esperada no equilíbrio de mutação-deriva genética (heq) (PIRY et al., 1999). A perda do número de alelos, especialmente raros, durante um efeito gargalo é muito mais rápida do que de heterozigosidade (he), o que explicaria o fato de $he > heq$. As análises seguiram os seguintes modelos de mutação para explicar a ocorrência de poliformismo em loci: *stepwise mutation model* (s.m.m) e *two-phase model* (t.p.m), que são recomendados para testar loci de microsatélites (LUIKART & COURNUET, 1998; Di RIENZO et al., 1994). Perry et al. (2012) sugeriram que as estimativas de s.m.m. para microsatélites são muitas vezes subestimadas e por isso recomendaram o uso de s.m.m com valor de $ps = 0.78$. Visto isso, os parâmetros escolhidos para t.p.m. foram de %s.m.m igual a 80% (perry et al., 2012; paris et al., 2015) e variância igual a 12, como recomendado por Piry et al. (1999). A significância do teste unicaudal para excesso de heterozigosidade foi avaliado pelo teste de wilcoxon ($p < 0.05$), que é recomendado em análises com < 20 loci e número mínimo de indivíduos igual a 30 (LUIKART & COURNUET, 1998; PIRY et al., 1999). Foram utilizadas 10.000 iterações para obtenção do suporte estatístico da análise.

4.2 DNA BARCODING

Os peixes estuarinos coletados foram provenientes de 15 campanhas realizadas pelo Laboratório de Ecologia de Peixes Marinhos (CEUNES/UFES) durante o período de setembro de 2018 a março de 2020 em sete unidades amostrais: Rio Barra Nova, Rio Doce, rio Ipiranga, rio Itaúnas, rio São Mateus, rio Caravelas e rio Piraquê-açu), sendo os rios Barra Nova e Itaúnas inseridos a partir do Ano 2. Os peixes recifais foram coletados pelo Laboratório de Ecologia e Conservação Marinha (LECoMar) – UFSB por meio de visitas a desembarques pesqueiros no estado do Espírito Santo, a fim de obter amostras provenientes da pesca de espinhel de fundo, de quatro regiões que ocorrem entre o sul da

Bahia e norte do Rio de Janeiro: Área 1, Norte de Abrolhos e Royal Charlotte; Área 2, Sul do Banco de Abrolhos; Área 3, Plataforma estreita entre Linhares e Piúma; e Área 4, Marataízes e norte do Rio de Janeiro.

As coletas de tecido dos peixes estuarinos, para as análises de DNA *Barcoding* e análises genéticas populacionais, foram realizadas pelo Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES, UFES; e a coleta dos tecidos de peixes recifais foi realizada pelo Laboratório de Ecologia e Conservação Marinha (LECoMar) – UFSB. Dos peixes estuarinos foi retirada uma pequena amostra de tecido muscular e dos peixes recifais uma pequena porção do raio da nadadeira caudal. Os fragmentos de tecidos coletados foram armazenados em microtubos contendo álcool 96% e acondicionados a -20°C no banco de tecidos do LGCA. Todos os microtubos foram identificados e etiquetados com todas as informações necessárias do indivíduo, como a sigla da espécie (identificação morfológica), o arrasto, o ponto, o rio e a data de coleta, conforme o exemplo abaixo (Figura 15).

Figura 15: Exemplo de etiqueta contendo todas as informações necessárias dos peixes marinhos. Indivíduo da espécie *Diapterus rhombeus* coletado no Rio São Mateus em 16 de novembro de 2018



O DNA das amostras foi extraído a partir do protocolo de solução salina (BRUFORD et al., 1992) e quantificado em espectrofotômetro. As soluções de DNA extraído foram diluídas para 20 ng/μL para padronizar as reações e evitar possíveis erros de amplificação devido ao excesso de material genético.

Para a amplificação do Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), foram utilizados os seguintes primers: FishF1- 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e FishR2- 5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3' (Ward et al. 2005). Depois de amplificados, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose (1%) corados com Gelred, visualizados e foto-documentados sob UV. Após a amplificação dos fragmentos de DNA, as reações foram purificadas utilizando a enzima ExoSap-IT e enviadas para sequenciamento em uma empresa terceirizada. Todas as sequências geradas foram editadas manualmente e alinhadas com o auxílio da ferramenta Muscle, utilizando o programa MEGA 7.026 (KUMAR, STECHER & TAMURA, 2016). Em seguida, as sequências geradas foram comparadas com sequências previamente publicadas em dois bancos de dados online, GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) e BOLD (www.boldsystems.org). A comparação com esses bancos de dados genéticos nos permite identificar o grau de homologia entre a sequência que possuímos e as

sequências depositadas. O grau de homologia nos fornece uma porcentagem que varia entre 0% a 100%, e quanto maior esse valor maior a proximidade genética existente entre as sequências. Após essa comparação as sequências foram classificadas como congruentes ou incongruentes. As amostras classificadas como congruentes foram aquelas cuja identificação molecular da espécie apresentou um grau de homologia entre 99% e 100%, em pelo menos um dos bancos de dados, e confirmou a identificação morfológica da espécie. As amostras incongruentes foram aquelas cuja identificação molecular não correspondeu à identificação morfológica.

Após a comparação das sequências nos dois bancos, um arquivo com as sequências que apresentaram um grau de homologia entre 99% e 100% em pelo menos um banco de dados foi gerado. A partir desse arquivo, utilizando-se o software MEGA 7.026 foi gerada uma árvore de Neighbor-Joining (SAITOU & NEI, 1987) com base no modelo de substituição de parâmetros Kimura-2 (K2P) (KIMURA, 1980). A confiança dos ramos foi verificada a partir dos valores de *bootstrap* com 10000 repetições (FELSENSTEIN, 1985).