

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

ADPS1 – Material Suplementar 1

Ambiente Dulcícola– Tema Perifíton - Metodologia

RT-42 JAN 23

RSE2022 PMBA/Fest

Vitória, Janeiro de 2023

As amostras da comunidade perifítica foram coletadas mensalmente, durante 42 meses, compreendendo o período de outubro/2018 a março/2020 (exceto outubro/2019) e dezembro/2020 a março/2022 (exceto março/2021), devido ao alto risco de transmissão da COVID-19, motivo também da suspensão das coletas no período de abril/2020 a novembro/2020. Totaliza-se, portanto, um total de 32 amostragens. Cada amostragem foi realizada em 12 estações ao longo do Baixo Rio Doce, no estado do Espírito Santo. Em cada uma das estações amostrais localizadas em ambientes lóticos, foram coletadas duas amostras, sendo uma por margem. Não foram encontrados substratos na região central da calha dos rios. Nas estações amostrais de ambientes lênticos, a comunidade perifítica foi coletada na margem mais próxima à localização do ponto amostral, onde houvesse disponibilidade de substratos colonizados. Por questões logísticas, não foram coletadas as seguintes amostras: E22 de OUT-18 (ambas as margens), E23 e E24 de NOV-18, E21D de JUL-19, e E22D de SET-19, todas as estações em OUT19, e E23 entre NOV-19 e SET/21.

Coleta e Análise

Em cada uma das estações amostrais foram coletadas, no mínimo, três unidades do mesmo substrato de modo que a quantidade de material perifítico fosse suficiente para os procedimentos analíticos. Para a padronização do substrato coletado entre as estações amostrais, a seguinte ordem de escolha foi utilizada: 1º - seixos (ou rochas); 2º - macrófitas aquáticas fixas (enraizadas); 3º - macrófitas aquáticas flutuantes. Na maior parte das estações amostrais, o substrato foi coletado de macrófitas fixas (Tabela 1 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Sempre que possível, o material perifítico foi coletado de macrófitas do mesmo gênero. Os substratos foram coletados de forma que a área colonizada pelo perifíton fosse mais facilmente determinada após a remoção do mesmo. No caso de substratos vivos (e.g., macrófitas), foi observada a idade do substrato, mantendo-se o cuidado para selecionar partes ou indivíduos de mesma idade (para evitar efeitos da sucessão na comunidade perifítica) e não estarem em fase de senescência (que também pode influenciar na estrutura da comunidade). Os substratos coletados foram armazenados em frascos com pequena quantidade de água destilada (câmara úmida), acondicionados em baixa temperatura, até serem levados ao laboratório. Em cada estação amostral foi coletada a quantidade de material perifítico suficiente para a análise qualitativa, análise quantitativa, de peso seco e da biomassa fotossintetizante (clorofila-a).

Tabela 1. Substratos coletados no monitoramento na bacia do Baixo rio Doce, sua classificação em relação à forma de vida, em quais estações foram encontrados e o número de amostras.

Substrato	Tipo	Estação	Nº Amostras
Acanthaceae	Macrófita fixa	E21, E22	10
Amaranthaceae	Macrófita fixa	E21, E26	5
Apocynaceae	Macrófita fixa	E21	1
Bambusoideae	Macrófita fixa	E21	6
Cascalho	Rocha	E0, E17	63

<i>Cortaderia selloana</i>	Macrófita fixa	E0	1
<i>Cuphea melvilla</i>	Macrófita fixa	E21, E22	52
<i>Eichhornia</i> spp.	Macrófita flutuante	E19, E20, E21, E22, E26	41
<i>Eleocharis</i> spp.	Macrófita fixa	E18, E23, E24	40
Euphorbiaceae	Macrófita fixa	E0	1
Galho	Fixo	E0, E22, E26	11
<i>Ipomoea</i> sp.	Macrófita fixa	E0	2
<i>Limnocharis</i> sp.	Macrófita fixa	E23, E24	2
<i>Ludwigia</i> sp.	Macrófita fixa	E0	1
<i>Mimosa</i> sp.	Macrófita fixa	E22	1
<i>Montrichardia linifera</i>	Macrófita fixa	E25a	1
<i>Nymphaea</i> spp.	Macrófita fixa	E18, E23, E24, E25a	48
<i>Panicum</i> spp.	Macrófita fixa	E0, E20, E21, E26	53
<i>Paspalum pilosum</i>	Macrófita fixa	E0	8
Poaceae	Macrófita fixa	E0, E20, E21, E22, E25a, E26	74
<i>Polygonum</i> sp.	Macrófita fixa	E0, E21	2
Pontederiaceae	Macrófita fixa	E23	1
<i>Sagittaria lancifolia</i>	Macrófita fixa	E23	7
<i>Talipariti pernambucense</i>	Macrófita fixa	E26	29
<i>Typha domingensis</i>	Macrófita fixa	E25	31

Processamento e análise das amostras em laboratório

Os substratos com perifíton foram levados ao laboratório e o material perifítico foi removido utilizando escova de cerdas macias e jatos de água destilada, sendo acondicionado em um volume conhecido (~200 ml). Dessa amostra total, alíquotas foram separadas para as análises qualitativas e quantitativas, peso seco, clorofila-a e preparação de lâminas permanentes de diatomáceas.

Para a análise qualitativa da comunidade, a alíquota foi fixada com solução formalina a aproximadamente 4% (4 ml de solução formalina para cada 100 ml de amostra). A identificação taxonômica foi realizada em microscópio óptico equipado com captura de imagem (câmera fotográfica) e todos os táxons esquematizados em microscópio com câmara clara e/ou fotografados.

Para análise taxonômica das diatomáceas, parte do material perifítico foi oxidado, segundo Battarbee et al. (2001), utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 35%) e ácido clorídrico (HCl 10%) e lâminas permanentes foram montadas utilizando Naphrax® (IR = 1,73) como meio de inclusão. Para a análise

quantitativa, as amostras foram fixadas com solução de lugol acético 1% e a determinação da densidade perifítica foi realizada em microscópio invertido (segundo UTERMÖHL, 1958), com tempo de sedimentação segundo Lund et al. (1958). A contagem foi realizada em campos aleatórios (UEHLINGER, 1964), e o limite de contagem foi determinado pela curva de rarefação de espécies (quando nenhuma espécie nova foi observada em, pelo menos, cinco campos analisados) e pelo menos 100 indivíduos da espécie mais abundante foram contados por amostra (FERRAGUT et al., 2013). Os cálculos da densidade de indivíduos seguiram Ferragut et al. (2013).

O peso seco e peso seco livre de cinzas da comunidade perifítica foram determinados pelo método de pesagem, segundo APHA (2005). A biomassa algal (representado pela clorofila-a, corrigida da feofitina) foi determinada pelo método de extração em etanol 90% aquecido, sem maceração (SARTORY & GROBELLAR, 1984) e os cálculos baseados em Golterman et al. (1978).

Análise de dados

As análises foram realizadas utilizando as médias entre margens para representar as estações amostrais dos ambientes lóticos (rio Doce e rio Guandu), considerando a similaridade entre as comunidades das duas margens opostas (RRDM, 2019), a determinação das condições ambientais da estação amostral apenas na calha do rio (e não nas duas margens), e o objetivo do monitoramento frente ao tamanho da malha amostral (pequenas diferenças entre as comunidades entre as margens poderiam causar confusão na interpretação geral dos resultados). Foram utilizados os dados abióticos gerados pelos subprojetos Limnologia e Metais e Contaminantes Orgânicos.

Mapas de Vetores Assimétricos (*Asymmetric Eigenvector Maps* - AEM; BLANCHET, LEGENDRE & BORCARD, 2008; 2009) foram utilizados para modelar a variação espacial da comunidade perifítica. Este modelo espacial cria novas variáveis que levam em consideração a direção dos fluxos de água e a conectividade das estações amostrais. O coeficiente I de Moran foi utilizado para a análise dos autovetores gerados e foram utilizados aqueles com autocorrelação espacial positiva e significativa ($P \leq 0.05$; BLANCHET et al., 2011; BERTOLO et al., 2012).

A partir dos dados quantitativos, foi avaliada a representatividade do esforço amostral na determinação do levantamento da biodiversidade de algas perifíticas pela curva de rarefação de espécies (MAGURRAN, 2011); a distribuição e o compartilhamento de espécies entre os ambientes (rios, lagos e lagoas) pelo diagrama de Venn; e a diversidade da comunidade perifítica a partir dos índices de Shannon, equitabilidade, e dominância de Simpson (MAGURRAN, 2011). Para a ordenação das estações amostrais de cada ambiente de acordo com a comunidade perifítica, foi realizada a análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS; LEGENDRE; LEGENDRE; 2012). Ainda, foram avaliadas as variações dos grupos funcionais descritos por Passy (2007), e complementados por Rimet e Bouchez (2011), baseados na forma de vida e adaptação das algas: baixo perfil (algas aderidas e dispostas próximas ao substratos), alto perfil (algas aderidas e dispostas em camadas superiores da matriz perifítica), móveis (algas não aderidas com capacidade de rápida movimentação), e

fitoplanctônica (algas não típicas da comunidade perifítica, não aderidas e com baixa ou nenhuma mobilidade). Também foram avaliadas a partir de bibliografia especializada, as espécies e gêneros de microalgas tolerantes e sensíveis a metais.

Para calcular a diversidade beta taxonômica entre os anos, tipos de ambientes e períodos hidrológicos foi utilizada uma análise permutacional de dispersões multivariadas (PERMDISP, função "betadisper"). Este teste é baseado na dissimilaridade média de cada unidade amostral ao centróide daquele grupo no espaço multivariado, através de uma matriz de distância. As tendências temporais na riqueza (taxonômica), densidade e biomassa foram testadas usando modelos aditivos de efeitos mistos generalizados (GAMM; função "gamm4"). A curva com a tendência temporal foi obtida pelo método de suavização LOESS (Locally-Weighted Scatterplot Smoother) (função "plotGAMM").

Todas as análises foram realizadas no programa R (versão 4.2.2; R CORE TEAM, 2022) utilizando o pacote *vegan* (OKSANEN et al. 2013) e *tydiverse* (WICKHAM et al. 2019).

REFERÊNCIAS

- APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 21st edition. APHA: Washington DC, p. 874, 2005.
- BATTARBEE, R. W. et al. Diatoms. In: SMOL, J. P.; BIRKS, H. J. B.; LAST, W. M. (eds.). **Tracking Environmental Change Using Lake Sediments**. London: Kluwer Academic Publishers, 2001. cap. 8, p. 155-203.
- BERTOLO A.; BLANCHET F.G.; MAGNAN P.; BRODEUR P.; MINGELBIER M.; LEGENDRE P. Inferring processes from spatial patterns: the role of directional and non-directional forces in shaping fish larvae distribution in a freshwater lake system. **PloS one**, v.7, e50239, 2012.
- BLANCHET, F.G.; LEGENDRE, P.; BORCARD, D. Modelling directional spatial processes in ecological data. **Ecological Modelling**. V. 215, p. 325-336, 2008.
- BLANCHET, F.G.; LEGENDRE P.; BORCARD, D. Erratum to "Modelling directional spatial processes in ecological data" [Ecological Modelling 215 (2008): 325-336]. **Ecological Modelling**, v.220, p.82-83, 2009.
- BLANCHET F.G.; LEGENDRE P.; MARANGER R.; MONTI D.; PEPIN P. Modelling the effect of directional spatial ecological processes at different scales. **Oecologia**, v.166, p.357-368, 2011.
- FERRAGUT, C., BICUDO, D.C. & VERCELLINO, I.S. Amostragem e medidas de estrutura da comunidade perifítica. In: A. SCHWARZBOLD, A. BURLIGA & L.C. TORGAN (eds.). *Ecologia do perifíton*. RiMa: São Carlos, p. 157- 177, 2013.
- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. 1978. **Methods for physical and chemical analisys of fresh waters**. 2a ed. Blackwell Scientific Publications: Oxford, p. 213, 1978.
- LEGENDRE P.; LEGENDRE L. **Numerical Ecology**. Elsevier Science Publication: London, p. 1006. 2012
- LUND, J.W.G., KIPLING, C. & LE-CREN, E.D. The inverted microscope method of estimating algal number and the statistical basis of estimating by counting. **Hydrobiologia**, v. 11, p. 143-170. 1958.
- MAGURRAN, A. E. **Medindo a diversidade biológica**. Editora UFPR: Curitiba, p.262, 2011.
- OKSANEN, J.; TONTERI, T. Rate of compositional turnover along gradients and total gradient length. **J. Veg. Sci.**, v.6, p.815–824, 1995
- PASSY, S. I. Diatom ecological guilds display distinct and predictable behavior along nutrient and disturbance gradients in running waters. **Aquatic Botany**, v. 86, p. 171–178, 2007.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2022.

RIMET, F.; BOUCHEZ, A. Use of diatom life-forms and ecological guilds to assess pesticide contamination in rivers: Lotic mesocosm approaches. **Ecological Indicators**, v. 11, p. 489–499, 2011.

RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual – Anexo 3 Dulcícola – Perifíton. RT-18I, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 60 pag. 2019.

SARTORY, D.P.; GROBBELAAR, J.E. Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis. **Hydrobiologia**, v. 114, p.177-187. 1984.

UEHLINGER, V. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. **Archives des Sciences**, v. 17, p. 121-123. 1964.

UTERMOHL, H. Zur Ver vollkommung der quantitativen phytoplankton-methodik. **Verh. Internat. Verein. Theor. Angew. Limnol.**, v. 9, p. 1-39. 1958.

WICKHAM, H.; AVERICK, M.; BRYAN, J.; CHANG, W.; MCGOWAN, L.D.; FRANÇOIS, R.; GROLEMUND, G.; HAYES, A.; HENRY L.; HESTER, J.; KUHN, M.; PEDERSEN, T.L.; MILLER, E.; BACHE, S.M.; MÜLLER, K.; OOMS, J.; ROBINSON, D.; SEIDEL, D.P.; SPINU, V.; TAKAHASHI, K.; VAUGHAN, D.; WILKE, C.; WOO, K.; YUTANI, H. Welcome to the *tidyverse*. **Journal of Open Source Software**, v.4, 1686, 2019.