

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

Material Suplementar Ambiente Marinho – Tema Fitoplâncton

RT- 43/ JUN 23

RA2022 PMBA/Fest

Vitória,

Junho de 2023

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	3
2	METODOLOGIA	3
2.1	COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	3
2.2	ANÁLISE.....	4
2.2.1	Material fitoplanctônico.....	4
2.2.2	Citometria de fluxo	5
2.2.3	Caracterização molecular	5
2.2.4	Análise de pigmentos clorofilianos	6
2.2.5	Eficiência fotossintética.....	7
2.2.6	Extração de DNA e amplificação por PCR	7
2.2.7	Sequenciamento de alto desempenho	7
2.2.8	Análise de bioinformática	7
2.2.9	Irradiância.....	8
2.2.10	Análise numérica	8
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS.....	10
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	11
3.1	ÍNDICE DE QUALIDADE DO FITOPLÂNCTON	12
3.2	DIVERSIDADE SHANNON	14
4	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	15
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

O histórico de malha e frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest) abrange informações de suma importância para o balizamento do presente programa, uma vez que passou por modificações ao longo do tempo, visando melhor atender aos objetivos do PMBA/Fest. Estas alterações foram aprovadas pela Câmara Técnica da Biodiversidade (CTBio) por meio de: (1) ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio, de outubro de 2019 (para o período de transição) e (2) Proposta Técnica de continuação do monitoramento, apresentada no primeiro semestre de 2022 visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest”.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) **MS - Malha e frequência amostrais**, onde as diferentes malhas e frequências amostrais são apresentadas nas abas “Ano 1”, “Transição”, “Novo Ciclo” e “Histórico Frequências” e 2) **MS – Mapas das malhas amostrais**, com a espacialização referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais coletadas entre setembro de 2018 e setembro de 2019, “Transição” às estações entre outubro de 2019 e julho de 2022 e “Novo Ciclo” referente às estações amostrais coletadas a partir de agosto de 2022.

2 METODOLOGIA

A metodologia apresentada contempla o escopo em vigência no momento de entrega deste relatório, ou seja, as amostragens e análises previstas para o Novo Ciclo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática – PMBA submetidas à Fundação Renova através do FORMULÁRIO DE APRESENTAÇÃO DE PLANO DE TRABALHO em 31 de agosto de 2022. Após a descrição da metodologia implementada, será apresentado um breve descritivo sobre as modificações metodológicas (parâmetros, análise de parâmetros ou grupo de parâmetros, dentre outros) que ocorreram ao longo da evolução do PMBA/Fest a fim de determinar os indicadores.

2.1 COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras do fitoplâncton e do bacterioplâncton na área de estudo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental (PMBA/Fest), foram coletadas em superfície e próximo do fundo conjuntamente com as amostragens para determinação das variáveis físico-químicas. As amostragens quantitativas dos componentes do fitoplâncton e bacterioplâncton foram realizadas nestas duas profundidades por meio de garrafa oceanográfica e fixadas com distintas soluções a fim de atender diferentes tipos de análises. Para análises do fitoplâncton em microscopia, as amostras foram fixadas com solução formalina (2-4%) neutralizada com hexametilenotetramina enquanto para análises do pico (auto e heterotrófico) por citometria de fluxo as amostras foram fixadas em glutaraldeído 0,5% por 15 minutos a temperatura ambiente e imediatamente congeladas em N-líquido até o momento da análise. As amostras para análise qualitativa do fitoplâncton foram coletadas por meio de arrastos

verticais de rede de plâncton com malha de 20µm de abertura, à baixa velocidade, na superfície das estações amostrais e fixadas com solução formalina entre 2-4%.

2.2 ANÁLISE

2.2.1 Material fitoplanctônico

As análises qualitativas foram realizadas em microscópios biológicos ópticos, equipados com câmera fotográfica para registros de imagens e ocular com retículo de medição calibrado. Os organismos foram registrados, analisando-se as suas características morfológicas e morfométricas, identificados por meio de bibliografia especializada clássica (e.g. TOMAS, 1997; SOURNIA, 1986; CHRÉTIENNOT-DINNET, 1990) e recentes. Os nomes científicos dos táxons registrados nas amostras foram padronizados por meio do banco de dados internacional Algaebase (<http://www.algaebase.org/>). A análise qualitativa da fração do picoplâncton (0,2 a 2µm), foi realizada por meio (i) da citometria de fluxo multiparamétrica que caracteriza, principalmente, picocianobactérias dos gêneros *Prochlorococcus* e *Synechococcus* pelos sinais de espalhamento de luz e fluorescência (MARIE et al. 2014) e (ii) por sequenciamento gênico. O sequenciamento gênico foi utilizado em duas abordagens: (i) para acessar a diversidade taxonômica da comunidade fitoplanctônica em amostras selecionadas da malha amostral, pela técnica de *metabarcoding* com sequenciamento de alto rendimento (NGS) e (ii) para resolver a identificação de táxons crípticos que sejam difíceis de caracterizar morfológicamente, de qualquer fração de tamanho, através de sequenciamento tradicional Sanger. Esta segunda abordagem subsidiará as análises de taxonomia clássica de parte do nano- e do microfitoplâncton.

A contagem do fitoplâncton (fração nano- e microfitoplâncton) foi realizada utilizando-se câmara de sedimentação de Utermöhl (1958) em microscópio invertido, após um tempo mínimo de 24 horas de sedimentação conforme Lund, Kipling e Le Cren (1958). Os resultados foram expressos em organismos por mL e convertidos em organismos por litros (abundância ou densidade de organismos), conforme Equação 1:

$$N = n \times A \times 1 V \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

N = Número de organismos por mL

n = número de organismos contados

a = Área contada

A = Área total da câmara

V = Volume total sedimentado

Durante a análise quantitativa em microscópio invertido, o fitoplâncton foi classificado em duas frações de tamanho: nanofitoplâncton (2 a 20 µm) e microfitoplâncton (maior que 20 µm).

2.2.2 Citometria de fluxo

Para as análises por citometria de fluxo, logo após a coleta cada amostra foi fixada com glutaraldeído na concentração final de 0,5%, em criotubos rotulados de 2mL, em duplicata, incubados por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, os criotubos foram armazenados em nitrogênio líquido. Na chegada ao laboratório as amostras foram estocadas em ultra-freezer (-80°C) até o momento de serem analisadas.

As frações do pico-, nano- e parte do microplâncton mais abundantes foram analisadas quantificadas por citometria de fluxo multiparamétrica em um citômetro de fluxo Cytotflex (Beckman Coulter) equipado com lasers violeta Fitoplâncton 261 (405nm), azul (488nm) e vermelho (628nm). As amostras armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. A fração autotrófica (cianobactérias e eucariotos unicelulares clorofilados) foi analisada de acordo com DUBELAR & JONKER (2000) e MARIE et al. (2014). O limiar de detecção (threshold) foi aplicado ao sinal de fluorescência vermelha emitida pela clorofila (canal FL3-H). Amostras foram aspiradas a uma velocidade entre 50 e 100 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 1 a 5 minutos. Foram coletados sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H), de fluorescência da clorofila, e dos pigmentos acessórios ficoeritrina e ficocianina, nos sensores correspondentes aos picos de emissão destes pigmentos.

A fração heterotrófica (bactérias e eucariotos unicelulares) foi analisada de acordo com MARIE et al. (1997). Alíquotas de 180 μL foram coradas com 20 μL do fluorocromo para ácidos nucleicos SYBR Green I (Thermo Scientific, referência S-7567) diluído 1000 vezes do original. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 15 min. Esferas fluorescentes de poliestireno de 1 μm foram adicionadas como controle interno e então analisadas por citometria de fluxo. O limiar de detecção foi aplicado ao sinal de fluorescência verde emitida pelo fluorocromo (canal FL1-H). Amostras foram aspiradas a uma velocidade entre 20 e 50 $\mu\text{L min}^{-1}$ por 1 a 2 min. Foram coletados os sinais de luz espalhada (FSC-H e SSC-H) e os sinais de fluorescência do SYBR Green I e pigmentos fotossintéticos. Para o processamento dos dados citométricos, os arquivos gerados pelo citômetro de fluxo no formato FCS foram analisados no programa CytExpert (Beckman Coulter, Brea, CA), para delimitação de populações alvo e cálculos de concentração de células.

2.2.3 Caracterização molecular

Parte da água coletada com garrafa oceanográfica, em estações amostrais selecionadas, foi filtrada a bordo para obtenção do material para caracterização molecular pela abordagem de *metabarcoding*. Para cada profundidade (superfície e a 1m do fundo) foram utilizados dois filtros de polycarbonato, de 0,4 e 10 μm . Foram filtrados 1L por, no máximo, 15 min. em cada filtro. Os filtros foram armazenados em criotubos e mantidos em nitrogênio líquido. No laboratório os criotubos foram transferidos para freezer (-80°C) até o processamento.

A técnica de *metabarcoding* será aplicada através da amplificação de regiões dos genes ribossomais 16S rDNA (16S-V4, PARADA et al. 2016) e 18S rDNA (18S-V8V9, DE VARGAS et al. 2015) para a caracterização taxonômica das comunidades do bacterioplâncton e fitoplâncton, respectivamente. Vale

ressaltar que cianobactérias, procariontes que compõe o fitoplâncton, são detectadas e caracterizadas junto ao bacterioplâncton. As reações de sequenciamento serão realizadas por empresa especializada utilizando técnicas de sequenciamento de alto rendimento (Next Generation Sequencing, NGS, plataforma Illumina), com a geração de 50.000 a 100.000 sequências/amostra. Esta cobertura permitirá uma caracterização abrangente das comunidades planctônicas estudadas (CARPORASO et al. 2012). A remoção de artefatos de sequenciamento será realizada com o software DADA2 (CALLAHAN et al. 2016) e a identificação taxonômica das sequências será realizada por análises de consenso de similaridade com os bancos de dados Silva 132 (QUAST et al. 2012) e PhytoRef/PR2 (DECILLE et al. 2015). O sequenciamento de Sanger será utilizado para identificação no nível de espécie de organismos de interesse ecológico (ex. alta abundância observada em amostras de interesse, potenciais indicadores de impacto, organismos mantidos em cultivo) e de difícil classificação morfológica (crípticas e/ou de pequeno tamanho). Essa identificação será realizada através do sequenciamento completo dos genes ribossomais 16S rDNA, para cianobactérias (SALOMON et al. 2003) e 18S rDNA, para eucariotos (KLOPPER et al. 2013). A classificação taxonômica será realizada a partir de reconstrução filogenética, comparando as sequências obtidas com sequências de linhagens conhecidas disponíveis no Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.2.4 Análise de pigmentos clorofilianos

Para a análise de pigmentos, alíquotas das amostras de água do mar foram armazenadas em frascos opacos de 2L e em seguida filtradas a bordo e ao abrigo da luz para posterior quantificação de pigmentos clorofilianos. Para isso, 500 mL de água foram filtradas em duplicatas sob um vácuo inferior a 200 mbar sobre filtros GF/F de 47mm de diâmetro montados em um sistema de filtração Sartorius. Imediatamente após a filtração, os filtros contendo o material particulado foram armazenados em frascos criogênicos de 2 mL e conservados em nitrogênio líquido até posterior análise espectrofluorimétrica em laboratório.

Para a extração dos pigmentos clorofilianos, os filtros GF/F foram retirados dos frascos criogênicos com auxílio de pinças Millipore® e transferidos para tubos de vidro de 10mL contendo 6 mL de acetona 90% (volume final). Em seguida os mesmos foram macerados com um bastão de vidro com a ponta recém-quebrada e os tubos de vidro contendo os extratos acetônicos lacrados com Parafilm® de modo a evitar a evaporação do solvente e uma consequente superestimação das concentrações pigmentares. Para a total extração dos pigmentos clorofilianos os tubos foram mantidos a 4 °C durante 12-16h. Após o período da extração os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm e a fluorescência do extrato medida em um espectrofluorímetro VARIAN CARY ECLIPSE®. O espectrofluorímetro foi calibrado a partir dos padrões de Clorofila a (C1a), e Clorofila b (C1b), Clorofilas c1+2 (C1c) e Divinil-Clorofila a (DHI) e seus respectivos pigmentos de degradação tipo feopigmentos. A pureza e a concentração destes pigmentos foram confirmadas por espectrofotometria. Os coeficientes específicos de fluorescência de cada pigmento foram estimados por diluição serial da solução estoque, e os respectivos pigmentos de degradação tipo feopigmentos obtidos por acidificação conforme as recomendações de NEVEUX & PANOUSE (1987). As concentrações pigmentares foram calculadas segundo método de NEVEUX & LANTOINE (1993) modificada por TENÓRIO *et al.* (2005). A resolução

de equações para obter a concentração dos pigmentos clorofilianos em microgramas por litro no extrato acetônico foi realizada por meio de uma rotina desenvolvida para o programa MATLAB.

A clorofila ativa (discriminada em clorofilas a, b, c1+c2 e divinilclorofila a), que reflete o estado fisiológico do fitoplâncton, foi calculada como uma razão das clorofilas em relação ao total de clorofilas mais seus respectivos feopigmentos, dado em porcentagem.

2.2.5 Eficiência fotossintética

Além da coleta de amostras para análise das comunidades do fitoplanctônica e bacterioplâncton foi realizada a estimativa de eficiência fotossintética (diferença entre fluorescência máxima e mínima – Fv/Fm), obtidas através do fluorímetro Aquaflash, e a mensuração da radiação fotossinteticamente ativa (RFA), utilizando-se um hidrorradiômetro (LiCor), acoplado a uma gaiola junto com a sonda YSI EXO 2, realizando perfilagens conjuntas e capturando dados na mesma frequência (1Hz).

2.2.6 Extração de DNA e amplificação por PCR

A extração do DNA foi feita com o sistema comercial Dneasy® PowerWater® kit (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e a avaliação da pureza do DNA extraído foram feitas por espectrofotometria (Nanodrop Lite). As medidas de pureza foram as razões entre as absorbâncias (em nm) 260/280 e 260/230. Para caracterização da diversidade do fito/bacterioplâncton foi escolhida a região hipervariável V3-V4 do marcador taxonômico universal, o DNAr 16S. Foram utilizados os iniciadores 341F e 785R (KLINDWORTH et al., 2013) acrescidos dos adaptadores requeridos para o sequenciamento na plataforma Illumina. Para a amplificação do DNA alvo foi utilizado o sistema comercial UCP HiFidelity PCR Kit (QIAGEN). A reação foi realizada em volume total de 20 µL contendo o DNA genômico (10-20 ng), ambos os iniciadores (0.25 µM de cada), o 4X Master Mix UCP incluindo a polimerase de alta fidelidade (1 mM) e água livre de nuclease (q.s.p. 20 µL). O programa térmico consistiu de desnaturação inicial a 94 oC (2 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 oC (30 s), anelamento a 55 oC (30 s) e extensão a 72 oC (40 s), seguidos de extensão final a 72 oC (7 min). A quantificação dos produtos amplificados foi feita por espectrofotometria (Nanodrop Lite). O tamanho dos produtos foi estimado por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5% m/v) com inclusão do padrão de massa molecular 100 bp DNA ladder (Promega).

2.2.7 Sequenciamento de alto desempenho

O sequenciamento será feito em plataforma Illumina miseq conforme recomendado pelo fabricante (Illumina, 2014). Espera-se obter leituras pareadas de 300 pb por amostra. As comunidades serão caracterizadas pela proporção das sequências de cada táxon presente nas amostras de água.

2.2.8 Análise de bioinformática

O resultado do sequenciamento será analisado seguindo o protocolo de bioinformática preconizado em Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) e implementado por meio do programa qiime2 (BOYLEN et al., 2019). A remoção de artefatos de sequenciamento será realizada com o software

DADA2 (CALLAHAN et al., 2016), permitindo identificar variantes biológicas de sequências (ASVs) dos genes amplificados. Para as comunidades de procariontes, a identificação taxonômica das ASVs será realizada por similaridade (blastn) comparando com a base de dados para o gene DNAr 16S SILVA v132, curada taxonomicamente (QUAST et al., 2013). Para as comunidades de protistas, a identificação taxonômica também será feita comparativamente usando o algoritmo BLAST e as bases de dados curadas taxonomicamente phytoREF (gene 16S plastidial, DECELLE et al., 2015) e PR2 (gene 18S nuclear, GUILLOU et al. 2012). As sequências processadas serão agrupadas por amostra e será construída uma tabela com as contagens de zOTUs e os metadados (feature table). As dissimilaridades entre as amostras serão calculadas na plataforma R (CORE TEAM, R. 2018) utilizando o pacote Vegan (OKSANEN et al., 2018) pela métrica Bray-Curtis, após transformação das proporções relativas da composição pela sua raiz quadrada. Essas distâncias serão visualizadas em um gráfico não métrico de escala multidimensional (nMDS). Os agrupamentos serão testados pela análise PERMANOVA global, além da análise par a par com a correção dos valores de significância por múltiplas comparações (FDR – False Discovery Rate) (BENJAMINI & HOCHEBERG, 1995).

2.2.9 Irradiância

Os perfis de RFA, fração de radiação incidente (%) para cada profundidade de coleta, e o coeficiente vertical de atenuação da luz – Kd (KIRK, 1986) foram calculados através dos dados de RFA obtidos pelo hidrorradiômetro e os dados de profundidade obtidos pela Sonda YSI EXO 2, utilizando-se as fórmulas abaixo:

$$(\%) \text{ radiação incidente} = \frac{(RFA_1 * 100)}{RFA_0} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

RFA_1 é a RFA aferida a determinada profundidade;

RFA_0 é a RFA aferida em subsuperfície (assim que o equipamento é imerso na água);

$$Kd(RFA) = \frac{\ln(I_0) - \ln(I_1)}{z} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

I_0 é a RFA aferida na subsuperfície;

Z_1 é a RFA aferida na profundidade para a qual se deseja calcular o Kd (RFA);

e z é a profundidade em metros (m) para a qual se deseja calcular o Kd (RFA).

2.2.10 Análise numérica

O índice de diversidade específica (Índice de Shannon) foi calculado a partir dos valores de densidade numérica por táxon do fitoplâncton, conforme o método proposto por SHANNON e WEAVER (1963).

Tal índice fornece uma medida do grau médio de incerteza em prever que espécies e indivíduos serão escolhidos aleatoriamente de um total de S espécies e N indivíduos (DAJOZ, 1973). MARGALEF (1976) ressalta que em comunidades naturais, os valores numéricos do índice de diversidade de Shannon-Weaver raramente excedem em cinco. Ademais, a diversidade em comunidades fitoplanctônicas está normalmente entre 1 e 2,5 em águas costeiras e entre 3,5 e 4,5 em águas oceânicas. Complementarmente, a equabilidade dos táxons foi obtida através da expressão de PIELOU (1977; 1966), cujos valores variam entre 0, uma comunidade totalmente desbalanceada (proporção de indivíduos por espécie), e 1, quando todos os táxons possuem o mesmo número de indivíduos. Foram também estimados índices de diversidade com os atributos citométricos da comunidade fitoplanctônica, seguindo proposição de LI (1997). Os dados citométricos foram processados no software FlowJo para remoção de partículas detriticas, ruído eletrônico e a população de esferas de controle interno. As estimativas de diversidade utilizarão os arquivos FCS previamente tratados, seguindo a rotina de agrupamento de PROPS et al. (2016) no ambiente R. Os parâmetros de interesse para as análises de diversidade citométrica foram: espalhamento de luz frontal e lateral (FSC-H e SSC- Fitoplâncton 262 H) e os sinais de fluorescência dos pigmentos naturais das células (clorofila, ficoeritrina e ficocianina). Índices de diversidade e equabilidade foram calculados com os atributos citométricos de forma análoga à descrita acima para os índices de diversidade específica (HILL, 1973).

Os dados foram analisados utilizando análises univariadas (e.g. ANOVA), respeitando o pressuposto de cada uma, para averiguar a diferença da média de variáveis em diferentes agrupamentos, como a setorização das estações amostrais e agrupamentos quanto a sazonalidade. Ainda, foram utilizadas análises de agrupamento para avaliar se os agrupamentos prévios supracitados foram convenientes para a comunidade fitoplanctônica e do bacterioplâncton. Por último análises multivariadas (e.g. PCA - Análise de Componentes Principais, RDA - Análise de Redundância, Partição da Variância), foram utilizadas para reduzir a dimensionalidade dos dados e buscar padrões espaciais e temporais de distribuição de espécies e variação da comunidade fitoplanctônica (LEGENDRE & LEGENDRE, 2012), relacionando com dados provenientes de outros eixos temáticos. Todas as análises foram realizadas no Programa R (R CORE TEAM, 2020) e pacotes específicos para análise de comunidades, como o vegan (OKSANEN et al., 2020).

O Índice de Qualidade do Fitoplâncton (IQF) foi calculado a partir dos valores de densidade total e da clorofila ativa da comunidade fitoplanctônica. Em relação à densidade total foram definidas duas categorias: as amostras que apresentaram valores $\leq 200 \text{ org.mL}^{-1}$ foram consideradas com valor “normal”, e as que possuíram densidades acima de 200 org.mL^{-1} retrataram um ambiente “alterado”. Em relação à clorofila ativa, foi estabelecido que as amostras com percentuais $\geq 70\%$ representaram um ambiente sem alteração, sendo classificado como “normal” e que aquelas com montantes inferiores a 70% de clorofila ativa demonstraram que o ambiente foi “alterado”. A partir das classificações qualitativas para cada indicador (densidade numérica e clorofila ativa), cada amostra foi categorizada em um índice cruzando as informações dos dois indicadores, da seguinte forma: Se os dois indicadores apresentassem a classificação “alterado”, o ambiente seria classificado como “Altamente Alterado”; Se um dos indicadores apresentasse a classificação normal e o outro alterado ou se só existisse um valor

de indicador para aquela amostra e a classificação fosse alterada, então o índice foi considerado “Moderadamente Alterado”; Nos caso em que ambos indicadores apresentassem a classificação normal, ou em casos em que só há dados de um indicador para aquela amostra e que estava identificado como normal, então seria classificado como “Normal”.

2.3 HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS

Alterações metodológicas foram realizadas no tema Fitoplâncton Marinho ao longo do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental (PMBA/Fest). A análise do fitoplâncton por imageamento em fluxo que foi realizada para este compartimento da biota na primeira fase do tema Fundos Recifais será descontinuada na migração das análises para o tema Fitoplâncton. O imageamento em fluxo, apesar de ser uma técnica que fornece informações de qualidade acerca do fitoplâncton, foi descontinuado a fim de otimizar variáveis com o intuito de ampliar o esforço na integração da comunidade fitoplanctônica com variáveis de outros temas. Pelo mesmo motivo de otimização de análise e integração com outros dados, houve a supressão da coleta do meio da coluna d'água para as análises quantitativas e de pigmentos, enquanto continuou-se o procedimento de coleta adotado para as profundidades de superfície e fundo da coluna d'água. Ainda, houve a interrupção da fixação de amostras qualitativas com solução de lugol neutro, pois observou-se que as amostras fixadas com solução de formalina a 2% neutralizada com hexametilenotetramina eram suficientes para levantamento qualitativo. A sonda YSI EXO2 passou a ser lançada como unidade *stand alone* (sem cabo e handheld), devido à utilização do cabo aumentar o risco de incidentes, como a necessidade de manobras para retirar cabo preso em alguma estrutura submersa e eventual dano ao equipamento.

Novas alterações metodológicas significativas ocorreram a partir da campanha de agosto de 2022 (Novo Ciclo). Análises do fitoplâncton que eram realizadas no contexto do tema Fundos Recifais foram transferidas para o tema Fitoplâncton Marinho, como é o caso da citometria de fluxo e metabarcoding. Ainda, as amostras qualitativas permaneceram sendo coletadas através de arrastos verticais, contudo, houve uma alteração na malha da rede de plâncton, na qual a malha de 60µm de abertura foi substituída pela malha de 20µm. Desta forma, será possível capturar taxons de menor tamanho e que não são retidos em malhas maiores (melhorando a análise qualitativa). Os pigmentos clorofilianos e seus feopigmentos foram analisados segundo o método de extração por acetona e leitura em espectrofotômetro até a campanha de maio/2022, sendo a leitura do extrato sendo lida em espectrofluorímetro a partir desta data.

É importante destacar que todas as alterações realizadas não impactaram nem impactarão o cumprimento das metas estabelecidas. Pelo contrário, as modificações visaram o aprimoramento logístico e analítico dos métodos estabelecidos nos protocolos.

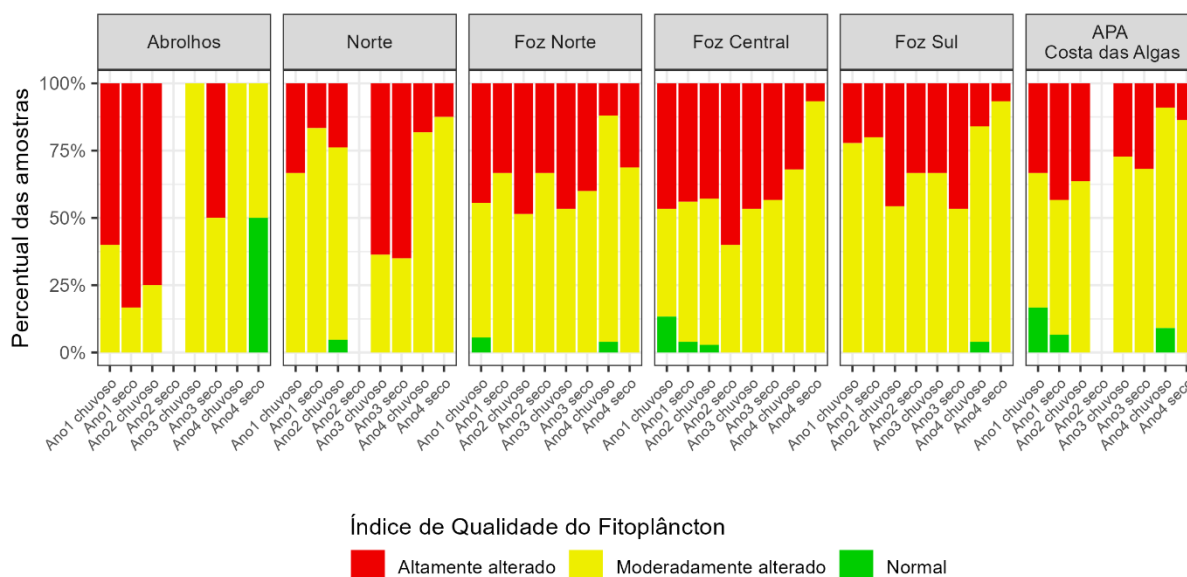
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest e obtidos ao longo do monitoramento (setembro/2018 – setembro/2022) na área ambiental I. Vale ressaltar que, os indicadores aqui apresentados têm como propósito clarificar e sintetizar a historicidade dos resultados, interpretação e conclusões do monitoramento, promovendo o acompanhamento espaço-temporal da qualidade ambiental e biodiversidade, além de configurarem importantes ferramentas de suporte a gestores ambientais. A partir destes indicadores, pode-se identificar os impactos com relação direta ou indireta ao rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana (MG).

Os indicadores do PMBA/Fest vêm se consolidando ao longo de quatro anos de monitoramento, onde seus principais resultados foram discutidos em todos os relatórios técnicos entregues até o presente, entretanto a partir do novo modelo de relatório solicitado via ofício SEI nº 85/2022-CTBio/DIBIO/ICMBio, proposto via ofício FR.2023.0214 (SEI13515133) e aprovado via ofício SEI nº4/2023-CTBio/DIBIO/ICMBio, a apresentação dos resultados será exclusivamente a partir da apresentação dos indicadores, acompanhados de legenda estendida com a explicação de sua variação espaço-temporal de forma mais direta e objetiva como se segue:

3.1 ÍNDICE DE QUALIDADE DO FITOPLÂNCTON

Figura 1: Índice de qualidade do fitoplâncton do fitoplâncton do Setor Abrolhos, Norte, Foz Norte, Foz Central, Foz Sul e APA Costa das Algas nas campanhas amostrais realizadas no PMBA/Fest, durante o Ano 1 (outubro/2018 a setembro/2019), Ano 2 (outubro/2019 a março/2020), Ano 3 (dezembro/2020 a setembro/2021) e Ano 4 (outubro/2021 a setembro/2022), no período seco (abril a setembro) e chuvoso (outubro a março). Entre abril/2020 e novembro/2020 ocorreu suspensão das atividades devido à pandemia da Covid-19.

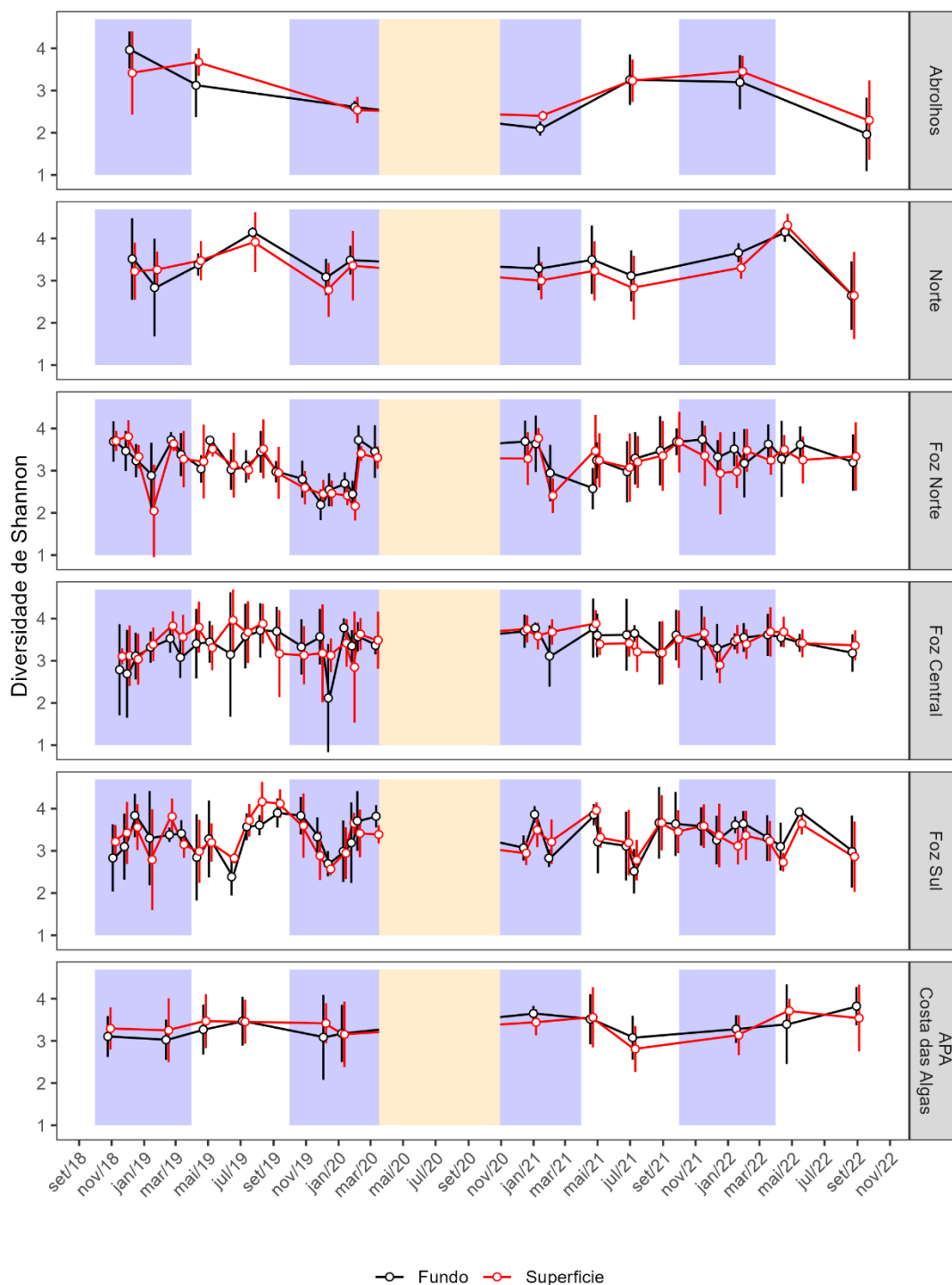


O Índice de Qualidade do Fitoplâncton aponta uma comunidade fitoplanctônica de moderadamente a altamente alterada e, grande parte das coletas, estando fora da normalidade, com as comunidades da Foz sendo as mais “Altamente alteradas” e estando o índice “Normal”, mesmo que em reduzidas proporções, mais restrito aos dois primeiros anos do monitoramento e no período chuvoso e na última estação seca (Ano 4) em Abrolhos. Observou-se que, ainda que o índice de qualidade ambiental apresente uma comunidade predominantemente alterada ao longo do tempo e espaço, o índice “Altamente alterado” apresentou um padrão de redução ao longo do monitoramento em todos os setores, com representações nulas, no período chuvoso, em Abrolhos, nos Anos 3 e 4. Com base nisso, pode-se constatar melhora nas condições ambientais em todos os setores, visto que nos setores Abrolhos, APA Costa das Algas e nos da Foz, o índice moderadamente alterado apresentou percentagens superiores a 50% a partir do Ano 3. Tal panorama pode ser devido a melhora na saúde fisiológica da comunidade fitoplanctônica ao longo do tempo nos setores monitorados, com valores de clorofila similares ao apresentado em período pré-rompimento e superando os de feopigmentos, o que poderia pressupor que a comunidade estaria em condições de estabilidade, com contínuos processos de reinício de sucessão da comunidade recém-perturbada, seja pelo aporte de material do Rio Doce em períodos de maior precipitação, bem como pela ressuspensão dos nutrientes para a coluna d’água por causa de eventos de aumento de energia das ondas na região monitorada (RRDM, 2022). Os dados de clorofila ativa e da composição quantitativa ao longo do monitoramento, que foram marcadas pelo aumento da contribuição de espécimes frágeis como os da Classe dos cocolitoforídeos, podem justificar a crescente percentagem da condição moderadamente alterado ao longo do tempo, indicando uma

possível recuperação da comunidade, embora a comunidade ainda apresente elevados valores de densidade, com picos de densidades sobretudo nos setores da Foz. Já a comunidade fitoplanctônica dos setores da Foz Norte, Foz Central e Foz Sul se encontram nas condições de maiores percentuais do índice “Altamente alterada”, pois os organismos nessa região são afetados de igual modo em função da sua proximidade com o Rio Doce, estando sob a influência da pluma do Rio e mais suscetíveis as alterações deletérias. Cabe mencionar que maiores percentagens do índice altamente alterado ocorreram nos setores Norte, Ano 3, e principalmente Abrolhos nos períodos seco do Ano 1 e chuvoso do Ano 2 demonstrando que a comunidade fitoplanctônica ainda prossegue sob a influência dos constantes distúrbios do ambiente, pois em Abrolhos, os períodos seco e chuvoso dos Anos 1 e 2, respectivamente, foram marcados pela tempestade tropical Iba, considerada a mais intensa dos últimos 10 anos no litoral brasileiro (RRDM, 2022).

3.2 DIVERSIDADE SHANNON

Figura 2: Variação da Diversidade de Shannon (diversidade específica) do fitoplâncton na superfície e fundo do Setor Abrolhos, Norte, Foz Norte, Foz Central, Foz Sul e APA Costa das Algas nas campanhas amostrais realizadas no PMBA/Fest, durante o Ano 1 (outubro/2018 a setembro/2019), Ano 2 (outubro/2019 a março/2020), Ano 3 (dezembro/2020 a setembro/2021) e Ano 4 (outubro/2021 a setembro/2022), sendo representado em branco o período seco e em cinza o período chuvoso. Entre abril/2020 e novembro/2020 ocorreu suspensão das atividades devido à pandemia da Covid-19.



A diversidade de Shannon da comunidade fitoplanctônica apresentou valores acima de 3,00 bits.organismo⁻¹ em todos os setores, sendo as diversidades da comunidade do período chuvoso pouco

superiores as apresentadas no período seco, sobretudo na Foz Norte, Foz Central e Foz Sul. Foi possível observar no Setor Abrolhos um padrão de evolução temporal. Os maiores valores de diversidade da comunidade ocorreram em dezembro de 2018, durante o período Chuvoso, em seguida houve o declínio da diversidade fitoplanctônica da região até janeiro de 2021 (Período Chuvoso) e posteriormente, apresentou novamente aumento em julho de 2021 (Período Seco) e janeiro de 2022 (Período Chuvoso). Não foi observado um padrão de evolução temporal evidente para a diversidade específica no setor da Foz Central, sendo similar entre os três primeiros anos (RRDM, 2022). Contudo, foi observada tendência de variação temporal no Setor Foz Norte, onde os menores valores médios ocorreram no Ano 2, quando comparados aos Anos 1, 3 e 4. No Ano 2 também ocorreu o aumento da proporção de cianobactérias (entre outubro de 2019 e março de 2020) levando a redução da diversidade local nesse período. Já os maiores valores de diversidade nas campanhas do período chuvoso do Ano 3 pode estar correlacionado a contribuição das diatomáceas entre dezembro de 2020 e março de 2021 nessa área (FEST, 2023: *Material Suplementar A3MFS2, Figuras 34 e 35*). Não foi possível observar tendência evidente para a diversidade específica no setor da Foz Sul ao longo dos anos, mas é perceptível notar uma tendência entre os valores de diversidade entre os períodos, sendo no chuvoso pouco maior que no seco, com o advento dos dados fornecidos pela amostragem do Ano 4. Cabe mencionar que maiores valores de diversidade nas campanhas do período chuvoso do Ano 3 também pode estar correlacionado a representatividade das diatomáceas, com notáveis contribuições em fevereiro de 2021. Os setores Norte e Costa das Algas não apresentaram variabilidade significativa na diversidade da comunidade fitoplanctônica, o que pode indicar uma estabilização da comunidade fitoplanctônica nessas regiões, à exceção da redução da diversidade na última amostragem do período seco no Setor Norte no Ano 4, justificadas pelo aumento da proporção de *Synechocystis* spp., da fração nanofitoplanctônica.

4 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todas as metas previstas para o Tema Fitoplâncton marinho foram cumpridas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)*, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- BOLYEN, E.; RIDEOUT J.R.; DILLON, M.R.; BOKULICH, N.A.; ABNET, C. C.; AL-GHALITH, G.A.; ALEXANDER, H.; ALM, E.J.; ARUMUGAM, M.; ASNICAR, F.; BAI, Y.; BISANZ, J.E.; BITTINGER, K.; BREJNROD, A.; BRISLAWN, C. J.; TITUS BROWN, C.; CALLAHAN, B.J.; CARABALLO-RODRÍGUEZ, A. M.; CHASE, J.; COPE, E. K.; DA SILVA, R.; DIENER, C.; DORRESTEIN, P.C.; DOUGLAS, G. M.;

CAPORASO, J. G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature biotechnology*, v. 37, n. 8, p. 852-857, 2019.

CALLAHAN, B.J.; MCMURDIE, P.J.; ROSEN, M.J.; HAN, A.W.; JOHNSON, A.J.A.; HOLMES, S.P., DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13 (7), pp.581, 2016.

CAPORASO, J.G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W.A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N., OWENS, S.M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME journal*, 6 (8), pp.1621-1624, 2012.

CHRÉTIENNOT-DINNET, M.J. Atlas du phytoplancton marin. Volume III: Chlorarachnophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglénophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnesiophycées, Rhodophycées et Tribophycées Avec la collaboration de Chantal Billard et Alain Sournia. pp. [1]-261. Paris: Éditions du Centre National de la Recherche Scientifique 15, quai Anatole France - 75700 Paris. 1990.

DAJOZ, R. *Ecologia Geral*. São Paulo, Vozes. 472p.,1973.

DE VARGAS, C.; AUDIC, S.; HENRY, N.; DECELLE, J.; MAHÉ, F.; LOGARES, R.; LARA, E.; BERNEY, C.; LE BESCOT, N.; PROBERT, I.; CARMICHAEL, M. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348(6237), p.1261605.-583, 2015.

DECELLE, J.; ROMAC, S.; STERN, R.F.; BENDIF, E.M.; ZINGONE, A.; AUDIC, S.; GUIRY, M.D.; GUILLOU, L.; TESSIER, D.; LE GALL, F.; GOURVIL, P. Phyto REF: a reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Molecular ecology resources*, 15(6), pp.1435-1445, 2015.

DUBELAAR, G.B.J.; JONKER, R.R. Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton. *Sci. Mar.* v. 64, p. 135-156, 2000.

ESTEVEZ, F.A. 2011. *Fundamentos de Limnologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Interciência.

GUILLOU, L.; BACHAR, D.; AUDIC, S.; BASS, D.; BERNEY, C.; BITTNER, L.; BOUTTE, C.; BURGAUD, G.; DE VARGAS, C.; DECELLE, J.; DEL CAMPO, J.; DOLAN, J.R.; DUNTHORN, M.; EDVARSEN, B.; HOLZMANN, M.; KOOISTRA, W.H.C.F.; LARA, E.; LE BESCOT, N.; LOGARES, R.; MAHÉ, F.; MASSANA, R.; MONTRESOR, M.; MORARD, R.; NOT, F.; PAWLOWSKI, J.; PROBERT, I.; SAUVADET, A.-L.; SIANO, R.; STOECK, T.; VAULOT, D.; ZIMMERMANN, P.; CHRISTEN, R. The Protist Ribosomal Reference database (PR2): a catalog of unicellular eukaryote small sub-unit rRNA sequences with curated taxonomy. *Nucleic acids research*, v. 41, n. D1, p. D597-D604, 2012.

HILL, M.O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54 (2): 427-432. 1973.

- KIRCHMAN, D. L. Microbial Ecology of the Oceans. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New Jersey. 593p. 2008.
- KIRK, J. T. O. Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. Cambridge University Press, 401p. 1986.
- KIRK, J.T.O. 1994. Light and photosynthesis in aquatic ecosystems. 2nd. Ed. Cambridge: Cambridge University Press, 528.
- KLÖPPER, S.; JOHN, U.; ZINGONE, A.; MANGONI, O.; KOOISTRA, W.H.C.; CAMBELLA, A. Phylogeny and morphology of a *Chattonella* (Raphidophyceae) species from the Mediterranean Sea: what is *C. subsalsa*? Eur. J. Phycol. 48, 79–92, 2013.
- LEGENDRE, P.; LEGENDRE, L. Numerical Ecology. 3ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.
- LI, W.K.W. Cytometric diversity in marine ultraphytoplankton. Limnol. Oceanogr. 42(5): 874-880. 1997.
- LI, W.K.W.; DICKIE, P.M. 2001. Monitoring phytoplankton, bacterioplankton, and virioplankton in a coastal inlet (Bedford Basin) by Flow Cytometry. Cytometry, n. 44, p.236-246.
- LUND J. W. G.; KIPLING, C. R., LENCREN, E.D. The inverted microscope method of estimating alga number and statistical basis of estimating by counting. Hydrobiologia, v.11, p. 143- 170, 1958.
- MAGURRAN, A.E.; MCGILL, B.J. 2011. Biological diversity: Frontiers in measurement and assessment. Oxford: Oxford University Press.
- MARGALEF, R. Diversity. In: SOURNIA, A. (Ed.). Phytoplankton manual. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle. UNESCO, 1976.
- MARIE D., RIGAUT-JALABERT F., VAULOT, D. An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples. Cytometry, v. 85, p. 962–968, 2014.
- NEVEUX, J.; LANTOINE, F. Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. Deep-Sea Res. I, v. 40, p. 1747-1765, 1993.
- NEVEUX, J.; PANOUSE, M. 1987. Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and pheophytins. Archiv für Hydrobiologie, Vol. 109 (4): 567-58.
- OXSANEN J., F. G. BLANCHET, R. KINDT, P. LEGENDRE, P. R. MINCHIN, R. B. O'HARA, G. L. SIMPSON, P. SOLYMOS, M. H. H. STEVENS, E. SZOECS; H. WAGNER, 2020. Package 'vegan'. R package version 2.5-7. <http://cran.rproject.org/web/packages/vegan/vegan.pdf>.
- PARADA, A.E.; NEEDHAM, D.M.; FUHRMAN, J.A. Every base matters: assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. Environmental microbiology, 18(5), pp.1403-1414, 2016.
- PIELOU, E. C. Mathematical ecology. New York: Wiley. 1977.

- PIELOU, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, v.13, p.131-144, 1966.
- PROPS R. et al. Measuring the biodiversity of microbial communities by flow cytometry. *Methods Ecol. Evol.* v. 7, p. 1376-1385, 2016.
- QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, 41(D1), pp. D590-D596., 2012.
- R CORE TEAM, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>.
- REYNOLDS, C.S. 2006. *Ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, 535p.
- RRDM, Rede Rio Doce Mar. Relatório Anual do PMBA/Fest-RRDM – Ambiente Marinho. RT-39D, Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Fundação Espírito-santense de Tecnologia. 1410 pag. 2022.
- SALOMON, P.S.; JANSON, S.; GRANÉLI, E. Molecular identification of bacteria associated with filaments of *Nodularia spumigena* and their effect on the cyanobacterial growth. *Harmful Algae*, 2(4), pp.261-272., 2003.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. *The mathematical theory of communication*. Illinois. University Press. Urbana, 1963.
- SOURNIA, A. 1986. *Atlas du phytoplankton marin*. Volume I: Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidiophycées. Éditions du Centre National de La Recherche Scientifique, Paris. 1986.
- TENÓRIO, M.M.B.; LE BORGNE, R.; RODIER, M.; NEVEUX, J. 2005. The impact of terrigenous inputs on the Bay of Ouinné (New Caledonia) phytoplankton communities: A spectrofluorometric and microscopic approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, Vol. 64: 531-545.
- TOMAS, C.R. *Identifying Marine Phytoplankton*. San Diego: Academic Press, 1997.
- UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton – methodik. *Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol.*, v.9, p. 1–38. 1958.
- VANZAN M. et al. Picoplankton and nanoplankton variability in an Antarctic shallow coastal zone (Admiralty Bay) during the austral summer of 2010/2011. *Polar Biol.* v.38, p. 1-18, 2015. ARIF, C. et al. Assessing Symbiodinium diversity in scleractinian corals via next-generation sequencing-based genotyping of the ITS2 rDNA region. *Mol. Ecol.* v. 23, p. 4418-4433, 2014.