

**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- 46/ JUN 24

RA2023 PMBA/Fest

Vitória,

Junho de 2024

EQUIPE TÉCNICA

Stéfano Zorzal de Almeida

Paulo Sergio Salomon

Ana Régia Depoli Cabral de Macedo

Arthur Weiss da Silva

Brener Freitas de Alvarenga

Cecília de Moraes Marino

Georgette Cristina Salvador Lázaro

Kássia do Nascimento Lemos

Kryсна Stephanny de Moraes Ferreira

Livia Bonetti Villela

Luige Gustavo Gerliel Lopes Dias

Márcio Murilo Barboza Tenório

Myllena da Silva Pereira

Paulo Iboschi Hargreaves

Pollyanna Pereira Borgo Auer

Tatiana Villalba Viana

SUMÁRIO

1	HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL	4
2	METODOLOGIA	4
2.1	COLETA E PRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	4
2.2	ANÁLISE.....	5
2.2.1	Material fitoplanctônico.....	5
2.2.2	Citometria de fluxo	6
2.2.3	Caracterização molecular	6
2.2.4	Análise de pigmentos clorofilianos	7
2.2.5	Eficiência fotossintética	8
2.2.6	Extração de DNA e amplificação por PCR	8
2.2.7	Sequenciamento de alto desempenho	9
2.2.8	Análise de bioinformática	9
2.2.9	Irradiância	9
2.2.10	Análise numérica	10
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS.....	11
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	12
3.1	ÍNDICE AMBIENTAL DO FITOPLÂNCTON MARINHO	13
3.2	DIVERSIDADE SHANNON	15
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS 5 ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO	17
5	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	17
6	REFERÊNCIAS	17

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

A malha e frequência amostral do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest) passou por modificações ao longo do tempo, visando seu aperfeiçoamento para atendimento 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 continuidade do monitoramento, apresentadas e aprovadas em 2022, visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest”.

As modificações implementadas se encontram nos seguintes Materiais Suplementares: 1) MS – Malha e Frequência amostral, 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 histórica referente às malhas amostrais dos Ambientes. Como forma de esclarecer os períodos contemplados em cada uma delas, “Ano 1” se refere às estações amostrais monitoradas 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 monitoradas a partir de agosto de 2022, à exceção do grupo da Ecotoxicologia, que iniciou a amostragem referente ao Novo Ciclo em janeiro de 2023.

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 agosto de 2022 (e dezembro de 2022 para o Tema Ecotoxicologia). 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-DINET, 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:

$$N = n \times A \times 10^3 \times V \quad (\text{Equação 1})$$

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 policarbonato, 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 (DECELLE 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 (C_{la}), e Clorofila b (C_{lb}), Clorofilas c₁₊₂ (C_{lc}) 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, c_{1+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 – F_v/F_m), 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;

I_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 Ambiental do Fitoplâncton Marinho (IAF) 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 entre 2% e 4% 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 táxons 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.

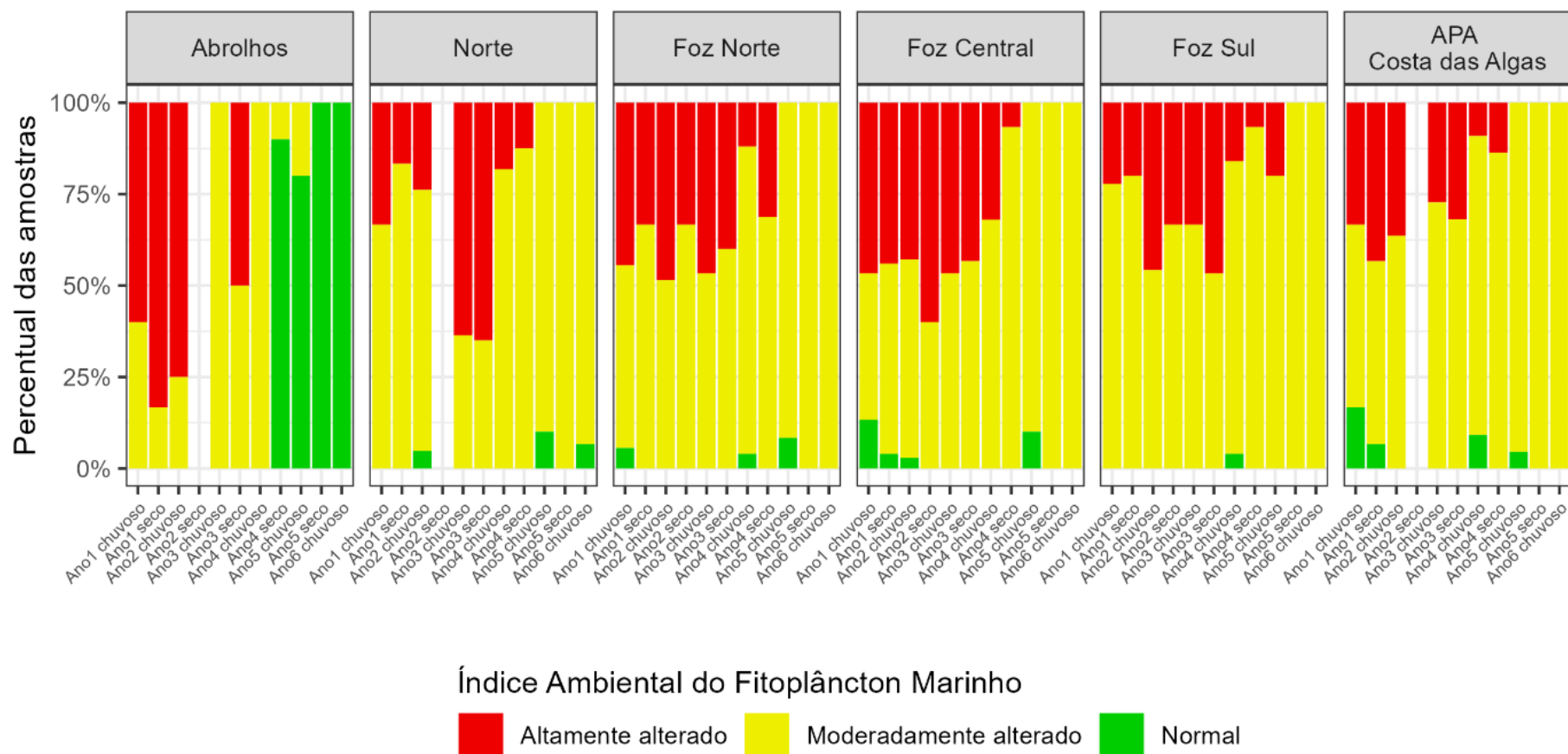
3 RESULTADOS DOS INDICADORES

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 de todo monitoramento 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 aos 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 do monitoramento e, seguindo a proposta estabelecida desde o Relatório Anual de 2022 (RA2022), 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 AMBIENTAL DO FITOPLÂNCTON MARINHO

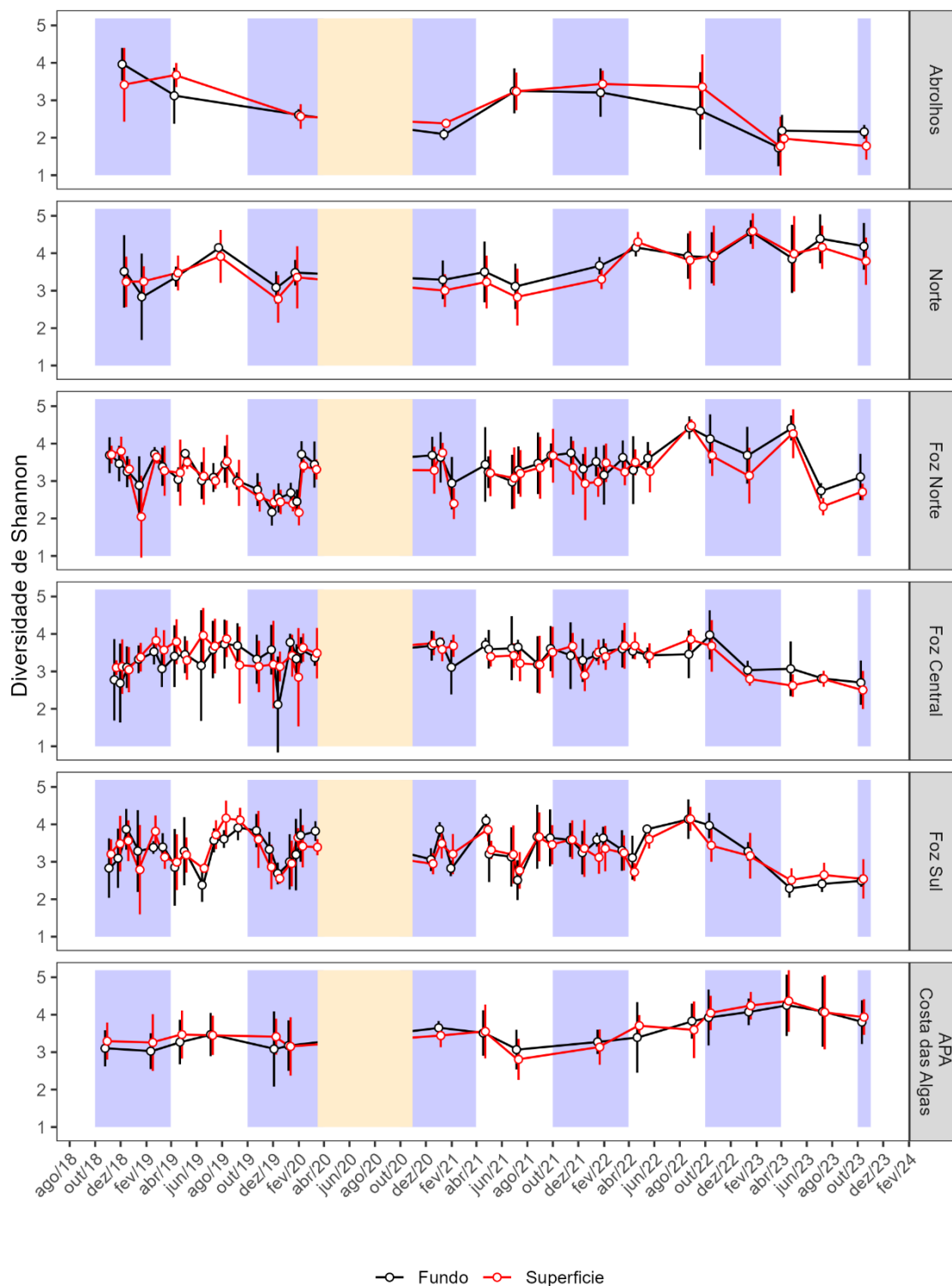
Figura 1: Percentual das categorias do Índice Ambiental do Fitoplâncton Marinho nos Setores Abrolhos, Norte, Foz Norte, Foz Central, Foz Sul e APA Costa das Algas nas campanhas amostrais realizadas no PMBA/Fest, durante o Ano 1 (outubro/2018 a setembro/2019), Ano 2 (outubro/2019 a março/2020), Ano 3 (dezembro/2020 a setembro/2021), Ano 4 (outubro/2021 a setembro/2022), Ano 5 (outubro/2022 a setembro/2023), e Ano 6 (outubro/2023) nos períodos secos (abril a setembro) e chuvosos (outubro a março). Entre abril/2020 e novembro/2020 ocorreu suspensão das atividades devido à pandemia da Covid-19.



O Índice Ambiental do Fitoplâncton Marinho indica que a comunidade fitoplanctônica pode ser classificada, em maior parte das amostras analisadas, como Moderadamente ou Altamente Alterada. A variação espaço-temporal indica uma melhora no índice ao longo do monitoramento, não apresentando em nenhum setor comunidades classificadas como altamente alteradas no período seco do Ano 5 e no chuvoso do Ano 6. Destaque para o setor Abrolhos, no qual todas as amostras analisadas nestes mesmos dois períodos foram classificadas como Normais. Dentre os setores, aqueles próximos da Foz (Foz Norte e Foz Central) foram os mais persistentes ao longo do tempo na manutenção de maior percentual de amostras classificadas como Altamente Alteradas. Para este indicado, contudo, não foram observadas tendência sazonais (entre períodos secos e chuvosos). Um ambiente classificado como Altamente Alterado apresentará uma comunidade com alta abundância e com a condição fisiológica debilitada. O primeiro ponto indica uma tendência à formação de florações, normalmente formadas de uma ou poucas espécies, que podem trazer prejuízos ao metabolismo do sistema (como diminuição da disponibilidade de oxigênio, principalmente no período noturno). A condição fisiológica debilitada indica o grau de senescência da comunidade, podendo implicar em impactos nos processos de produtividade primária e, consequentemente, nas teias tróficas (considerando que o fitoplâncton é grupo base deste processo). Portanto, a melhora do indicador ao longo do monitoramento é indicativo de melhora nas condições ambientais que permitem a manutenção de uma densidade relativamente mais baixa (por meio de competição entre espécies, inclusive aquelas sensíveis e predação por zooplâncton) e de uma comunidade fitoplanctônica com organismos mais íntegros. Os resultados estão de acordo com o indicativo de melhora de qualidade no ambiente marinho.

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), Ano 4 (outubro/2021 a setembro/2022), Ano 5 (outubro/2022 a setembro/2023), e Ano 6 (outubro/2023), sendo representado em branco o período seco e em azul o período chuvoso. Entre abril/2020 e novembro/2020 (área bege) 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 ao longo do monitoramento, no período chuvoso, um pouco superiores às apresentadas no período seco, sobretudo na Foz Norte, Foz Central e Foz Sul (padrão temporal que acompanha as variações qualidade da água durante o PMBA/Fest). Nesses setores, houve evidente diminuição da diversidade a partir do período chuvoso do Ano 5 até a última campanha (chuvoso do Ano 6), sendo observados os menores valores ao longo do monitoramento. De maneira oposta, foi registrada melhora na diversidade nos setores Norte e APA Costa das Algas, sendo esta observada desde o período seco do Ano 3. Os maiores valores de diversidade da comunidade desses setores ocorreram no período chuvoso do Ano 5, atingindo valores maiores que 4,00 bits.organismo⁻¹, sendo os maiores observados em todo o monitoramento. Para o setor Abrolhos não há sazonalidade, mas é possível observar diminuição da diversidade a partir do período chuvoso do Ano 5. A diminuição da diversidade apenas nos setores da Foz do Rio Doce é um indicativo da influência do rio na comunidade fitoplanctônica, podendo indicar que ainda há efeito do rejeito proveniente da bacia do Rio Doce. Distúrbios ambientais são importantes fatores responsáveis pela diminuição da diversidade fitoplanctônica (POLISHCHUK, 1999), podendo esta ser a causa dessa diminuição. Espécies sensíveis são as primeiras a serem localmente extintas, restando apenas espécies tolerantes aos distúrbios, resultando na baixa diversidade. A diminuição dessa diversidade pode causar a diminuição da disponibilidade de alimento para níveis tróficos superiores (por restarem apenas espécies resistentes a predação – toxinas, espinhos, defesas químicas, etc.). Ainda, uma comunidade fitoplanctônica com baixa diversidade de espécies pode não resistir a um novo distúrbio (natural ou antropogênico), comprometendo o reestabelecimento da comunidade fitoplanctônica local e os processos atrelados a ela (e.g. produtividade primária ou ciclagem de nutrientes).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS 5 ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO

Em um primeiro momento, os indicadores podem trazer conflitos de informação, especialmente para os setores da Foz do Rio Doce (Central, Sul e Norte). Entretanto, o Índice de Ambiental do Fitoplâncton Marinho traz informação sobre a biomassa da comunidade, que apresenta melhora em relação a quantidade (densidade total) e, especialmente, na qualidade (clorofila ativa) ao longo do monitoramento. É totalmente plausível que haja melhora nesta biomassa sem que necessariamente haja melhoras no indicador de diversidade – simplesmente as espécies que ainda estão presentes no ambiente estão em densidade baixa e com níveis de clorofila não degradada alta. Dessa forma, podemos considerar que o fitoplâncton da região de estudo tem apresentado melhora de qualidade em termos de quantidade e saúde, mas, para a região da Foz do Rio Doce, ainda há condições que alteram a diversidade local aparentemente relacionadas com o Rio Doce e a porção marinha da região.

5 ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS

Todos os itens previstos foram cumpridos para o Tema.

6 REFERÊNCIAS

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-DINET, M.J. Atlas du phytoplancton marin. Volume III: Chlorarachnophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglenophycées, 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.; CAMBELL, 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.
- OKSANEN 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.
- POLISHCHUK, L. V. Contribution analysis of disturbance-caused changes in phytoplankton diversity *Ecology*, v.80, p. 721-725, 1999.
- 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.