

**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-52/OUT 25

RSE2025 PMBA/FEST-UFES

Vitória,

Outubro de 2025

EQUIPE TÉCNICA

Stéfano Zorzal de Almeida (coordenador)

Paulo Sergio Salomon (coordenador)

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

Krysna Stephanny de Morais Ferreira

Livia Bonetti Villela

Luige Gustavo Gerliel Lopes Dias

Márcio Murilo Barboza Tenório

Myllena da Silva Pereira

Paulo liboshi 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.....	5
2.2	ANÁLISE.....	5
2.2.1	Material fitoplanctônico.....	5
2.2.2	Citometria de fluxo	6
2.2.3	Caracterização molecular	7
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.....	10
2.2.10	Análise numérica	10
2.3	HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES E ADAPTAÇÕES DE METODOLOGIAS.....	12
3	RESULTADOS DOS INDICADORES	12
3.1	ÍNDICE AMBIENTAL DO FITOPLÂNCTON MARINHO	14
3.2	DIVERSIDADE	16
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS ANOS DE MONITORAMENTO ACERCA DOS INDICADORES OBSERVADOS E O AMBIENTE MONITORADO	18
5	ITENS PREVISTOS E NÃO REALIZADOS: JUSTIFICATIVAS	18
6	REFERÊNCIAS	18

1 HISTÓRICO DE MALHA E FREQUÊNCIA AMOSTRAL

A malha e frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest-UFES) passou por modificações ao longo do tempo, visando seu aperfeiçoamento para atendimento aos objetivos do Programa. Estas alterações foram orientadas pela Câmara Técnica da Biodiversidade (CTBio) e aprovadas pelo Comitê Interfederativo (CIF), por meio de: (1) Ofício SEI nº 1/2020-CTBio/DIBIO/ICMBio, de outubro de 2019 (para o período de transição), (2) Proposta Técnica de continuidade do monitoramento, apresentadas e aprovadas em 2022, visando o “Novo Ciclo do PMBA/Fest-UFES” e (3) Ofício SEI Nº 32/2024/CTBio/DIBIO/ICMBio, Nota Técnica nº 1/2024-CTBio/DIBIO/ICMBio e Deliberação CIF nº 803, de 08 de agosto de 2024.

As modificações implementadas encontram-se nos seguintes Materiais Suplementares, os quais contemplam todo o período de execução do PMBA/Fest-UFES: 1) MS – Malha amostral, que apresentam as estações amostrais executadas ao longo do tempo por todos os Anexos/Temas, separados por cada marco temporal histórico mencionado acima (“Ano 1”, “Transição”, “Novo Ciclo” e “Deliberação 803”); 2) Frequência amostral, o qual contempla o histórico da periodicidade amostral (seguindo os mesmos Anexos/Temas contemplados no item 1) e 3) MS – Mapas históricos das malhas amostrais, que apresenta os mapas das malhas amostrais (incluindo as estações) executadas por todos os Anexos/Temas.

Segue o detalhamento temporal, como forma de esclarecer a execução dentro dos marcos históricos: “Ano 1” (setembro de 2018 e setembro de 2019); “Transição” (outubro de 2019 e julho de 2022); “Novo Ciclo” (agosto de 2022 a setembro de 2024) e “Deliberação 803” (outubro de 2024 a março de 2026). O grupo da Ecotoxicologia é uma exceção a esta historicidade, pois iniciou a amostragem referente ao “Novo Ciclo” em janeiro de 2023 e segue com a “Deliberação 803”, na periodicidade já informada.

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/Fest-UFES 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) e na Deliberação CIF nº 803, de 08 de agosto de 2024. 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-UFES 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-UFES), 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, e 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 morfolologicamente, de qualquer fração de tamanho, através de sequenciamento tradicional Sanger. Esta segunda abordagem subsidia 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 e 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 DUBELAAR & 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 µL 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 180µL foram coradas com 20µL 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 1µm 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 µL 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 10µm. 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* foi 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 foram 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 permite uma caracterização abrangente das comunidades planctônicas estudadas (CAPORASO *et al.* 2012). A remoção de artefatos de sequenciamento foi realizada com o software DADA2 (CALLAHAN *et al.* 2016) e a identificação taxonômica das sequências foi realizada por análises de consenso de similaridade com os bancos de dados Silva 132 (QUAST *et al.* 2013) e PhytoRef/PR2 (DECILLE *et al.* 2015). O sequenciamento de Sanger foi 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 foi realizada através do sequenciamento completo dos genes ribossomais 16S rDNA, para cianobactérias (SALOMON *et al.* 2003) e 18S rDNA, para eucariotos (KLÖPPER *et al.* 2013). A classificação taxonômica foi 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), modificado 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 fitoplâncton 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 absorvâncias (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 em desnaturação inicial a 94 °C (2 min), seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C (30 s), anelamento a 55 °C (30 s) e extensão a 72 °C (40 s), seguidos de extensão final a 72 °C (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 foi feito em plataforma Illumina miseq, conforme recomendado pelo fabricante (Illumina, 2014), objetivando obter leituras pareadas de 300 pb por amostra. As comunidades foram caracterizadas pela proporção das sequências de cada táxon presente nas amostras de água.

2.2.8 Análise de bioinformática

O resultado do sequenciamento foi analisado seguindo o protocolo de bioinformática preconizado em Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) e implementado por meio do programa qiime2 (BOLYEN *et al.*, 2019). A remoção de artefatos de sequenciamento foi 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 foi 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 foi 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 foram agrupadas por amostra e foi construída uma tabela com as contagens de zOTUs e os metadados (feature table). As dissimilaridades entre as amostras foram calculadas na plataforma R (CORE TEAM, R. 2020) utilizando o pacote Vegan (OKSANEN *et al.*, 2020) pela métrica Bray-Curtis, após transformação das proporções relativas da composição pela sua raiz quadrada. Essas distâncias foram visualizadas em um gráfico não métrico de escala multidimensional (nMDS). Os agrupamentos foram 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 utilizaram 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 ≤ 200 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 seria 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-UFES). A análise do fitoplâncton por imageamento em fluxo, que foi realizada para este compartimento da biota na primeira fase do tema Fundos Recifais, foi 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, é 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 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

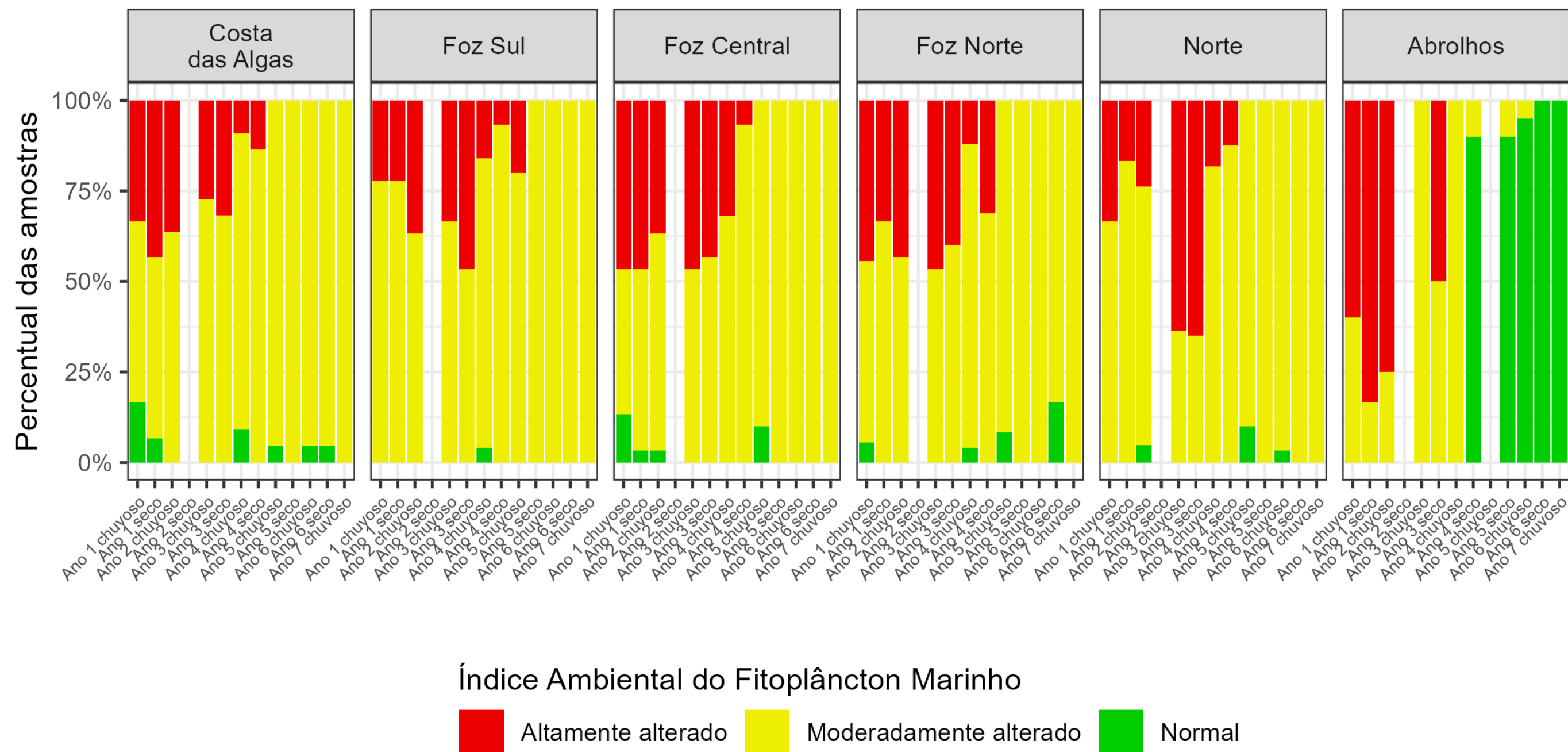
Nesta seção serão apresentados os resultados dos indicadores de qualidade ambiental e da biodiversidade aquática do Tema, os quais foram desenvolvidos pelo PMBA/Fest-UFES e obtidos ao longo de todo monitoramento na área ambiental I. Vale ressaltar que, os indicadores aqui apresentados têm como propósito 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-UFES 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-UFES, 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), Ano 6 (outubro/2023 a setembro/2024) e Ano 7 (outubro/2024 a março/2025) 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.



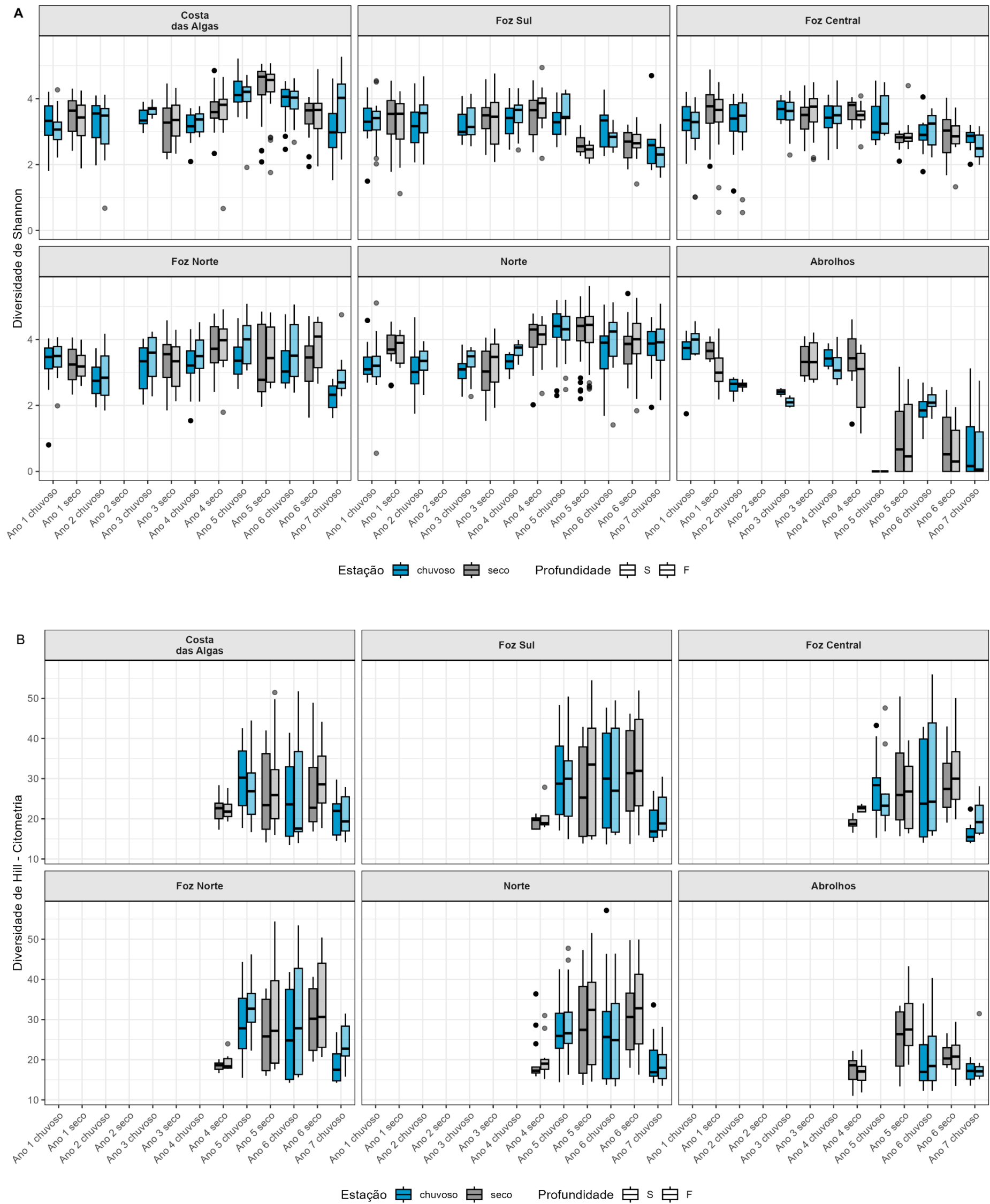
* Em relação ao RA2024, algumas amostras foram reajustadas considerando sua sazonalidade, em especial dados da região da Foz que foram coletados logo antes da pandemia. Esses dados foram incluídos como período seco do Ano 2 no RSE2024, quando deveriam estar relacionados ao período chuvoso do Ano 2. Assim, como os resultados são apresentados como percentual de amostras classificadas dentro de cada categoria do índice, é natural que haja alguma mudança. Contudo, não houve alterações significativas na avaliação do impacto na comunidade fitoplanctônica.

A avaliação temporal do Índice Ambiental do Fitoplâncton Marinho evidencia, de forma geral, uma redução progressiva na frequência de amostras classificadas como Altamente Alteradas ao longo do período de monitoramento. A partir do período seco do Ano 5, nenhuma amostra apresentou esse nível de alteração, sendo a maioria enquadrada na categoria Moderadamente Alterada. A tendência de diminuição da ocorrência da condição Altamente Alterada torna-se perceptível a partir do Ano 3 em todos os setores avaliados, exceto no setor Norte e Foz sul (a partir do Ano 4). No setor Abrolhos, destaca-se a melhoria mais expressiva, com predominância de amostras classificadas como Normal a partir do período seco do Ano 4. Embora essa condição também tenha sido registrada nos demais setores, sua ocorrência foi pontual e sem padrão espacial definido, mantendo-se a dominância de comunidades fitoplanctônicas classificadas como Moderadamente Alteradas. Por outro lado, o setor Foz Sul) apresenta maior persistência temporal de comunidades classificadas como Altamente Alteradas, indicando maior resistência à recuperação ambiental nesse trecho da costa. Em uma análise de menor escala temporal, abrangendo o período entre o Ano 5 (período seco) e o Ano 7 (período chuvoso), não se observam alterações significativas no Índice Ambiental do Fitoplâncton, que permanece predominantemente indicando impacto moderado na maior parte dos setores monitorados.

Um ambiente classificado como Altamente Alterado é caracterizado pela presença de uma comunidade fitoplanctônica com condição fisiológica comprometida — evidenciada por baixos teores de clorofila ativa — associada a uma elevada densidade celular. A redução da atividade fotossintética sugere um estado avançado de senescência populacional, o que compromete a produtividade primária e, por consequência, influencia negativamente as cadeias tróficas marinhas. Tal comprometimento fisiológico pode decorrer de condições ambientais adversas ao crescimento do fitoplâncton, como limitação de nutrientes, alterações na salinidade ou temperatura, ou ainda pela presença de substâncias tóxicas. A elevada abundância de indivíduos, por outro lado, pode indicar a ocorrência de florações dominadas por poucas espécies oportunistas, frequentemente tolerantes ao estresse, capazes de alterar significativamente o metabolismo do ecossistema, como por exemplo, por meio da redução do oxigênio dissolvido durante o período noturno devido à intensa respiração. Além disso, essa condição pode refletir a exclusão competitiva de espécies mais sensíveis, resultando na simplificação estrutural da comunidade. A persistência desse estado pode configurar um regime estável alternativo, no qual a comunidade permanece em um estágio de baixa diversidade e funcionalidade reduzida, sendo necessária uma perturbação significativa ou medidas de manejo específicas para promover a transição a um estado mais equilibrado. A melhoria progressiva desse indicador ao longo do tempo é, portanto, indicativa de resiliência ecológica, refletindo a capacidade do sistema de retornar a uma condição mais complexa e funcional após o distúrbio.

3.2 DIVERSIDADE

Figura 2: Variação da (A) Diversidade de Shannon, para as frações iguais e maiores que nanofitoplancônica, e (B) Diversidade de Hill de ordem 1 (diversidade específica = exponencial de Shannon), para as frações iguais e menores que a nanofitoplancônicas, na superfície (S) e fundo (F) dos Setores Abrolhos, Norte, Foz Norte, Foz Central, Foz Sul e APA Costa das Algas nas campanhas amostrais realizadas no PMBA/Fest-UFES, 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), Ano 6 (outubro/2023 a setembro/2024) e Ano 7 (outubro/2024 a março/2025), sendo representado em cinza o período seco e em azul o período chuvoso. Entre abril/2020 e novembro/2020 ocorreu suspensão das atividades devido à pandemia da Covid-19. A diversidade de Hill, pelo método de citometria, foi determinada somente a partir do período Seco do Ano 4. Cores mais vivas indicam medidas da superfície e cores mais claras indicam medidas do fundo. Os pontos mostram os valores de outliers dos box-plot.



* Em relação ao apresentado no RA2024 houve uma mudança de apresentação gráfica para o indicador Diversidade. Essa alteração fez-se necessária pela grande quantidade de dados. A apresentação por campanha gerava um excesso de saturação gráfica que dificultava a visualização dos padrões espaciais. O gráfico de box-plot mostrou-se mais adequado, considerando a dinâmica sazonal abordada no RSE2025. Ainda, foram incluídos dados de diversidade da menor fração do fitoplâncton (nano e menor), analisados a partir do período seco do Ano 4 e formando a partir do RSE2025 uma série temporal mais robusta.

A diversidade de Shannon da comunidade fitoplânctônica (fração nano e micro) possui tendência geral de estabilidade até o Ano 4, com aumento dos valores durante o Ano 5, e diminuição para valores abaixo daqueles registrados no início do monitoramento até o Ano 7. Entretanto, o comportamento ao longo de todo o monitoramento é diferente entre os setores. O setor APA Costa das Algas/REVIS Santa Cruz apresentou um pico de diversidade durante o período seco do Ano 5, onde são registradas as maiores medianas de diversidade do monitoramento (cerca de 4,5 bits.organismo⁻¹). Padrão semelhante é observado no setor Norte, porém, este apresentou uma diminuição de diversidade menos acentuada do que no setor APA Costa das Algas/REVIS Santa Cruz. De forma oposta, nos setores da Foz não foi observado este pico de aumento de diversidade, especialmente nos setores Foz Sul e Foz Central. Nestes setores foram registradas diminuições consideráveis a partir do período seco do Ano 5, com as menores medianas registradas na Foz desde o início do monitoramento. Esta diminuição está ocorrendo de forma progressiva ao longo dos últimos períodos chuvosos e secos do monitoramento (Anos 6 e 7). O setor Foz Norte, por sua vez, apresentou ligeira tendência à diminuição, apesar da alta variabilidade dos resultados, mas com uma clara diminuição dos valores de diversidade no período chuvoso do Ano 7, onde foram registrados os menores valores de diversidade para o setor. O setor Abrolhos, por sua vez, apresentou desde o período seco do Ano 5 os menores valores de diversidade observados no monitoramento do fitoplâncton marinho (a maioria abaixo de 2,0 bits.organismo⁻¹). Há também, para o setor, tendência de diminuição dessa diversidade ao longo do tempo, com uma aparente recuperação no período seco do Ano 3 e chuvoso do Ano 6.

A diversidade de Hill de ordem 1 é baseada em parâmetros citométricos das células, majoritariamente do pico e nanofitoplâncton, e foi introduzida no monitoramento no período seco do Ano 4. A análise mostra padrões semelhantes aos encontrados para a diversidade de Shannon. Contudo, as leituras possuem uma alta variabilidade dentro dos períodos (seco ou chuvoso) de cada ano, especialmente no período seco do Ano 5 e no período chuvoso do Ano 6. Há, para todos os setores, diminuição dos valores de diversidade no período chuvoso do Ano 7, estando consonante com os resultados encontrados para a maior fração de tamanho do fitoplâncton e indicando um efeito generalizado de diminuição de diversidade do fitoplâncton.

Distúrbios ambientais exercem um papel determinante na redução da diversidade fitoplânctônica, podendo inclusive configurar-se como o principal fator responsável por esse declínio (POLISHCHUK, 1999). Em geral, as espécies mais sensíveis são as primeiras a sofrerem extinção local, persistindo apenas aquelas com maior tolerância aos estressores ambientais. Esse processo seletivo resulta na simplificação da comunidade, com consequente diminuição da diversidade específica. A perda de diversidade pode comprometer a disponibilidade e a qualidade dos recursos alimentares para os níveis tróficos superiores, não necessariamente em função da biomassa disponível, mas devido à dominância de espécies com mecanismos de defesa contra a predação — como produção de toxinas, presença de espinhos ou outras defesas químicas —, que reduzem a eficiência da transferência de energia na teia trófica. Ademais, comunidades fitoplânctônicas com baixa diversidade tendem a apresentar menor resiliência, tornando-se mais vulneráveis a novos distúrbios,

sejam eles de origem natural ou antrópica. Essa limitação compromete a capacidade de recuperação da comunidade local e afeta diretamente processos ecológicos essenciais, como a produtividade primária, a ciclagem de nutrientes e a estabilidade do ecossistema.

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

A ausência de uma linha de base robusta dificulta a caracterização das condições originais da comunidade fitoplanctônica na região antes da chegada do Material Ligado ao Desastre, ou mesmo de impactos anteriores, como os decorrentes das mudanças climáticas. De modo geral, os resultados sugerem que a comunidade fitoplanctônica tem apresentado mudanças gradativas em direção a condições menos impactadas. Entre os setores avaliados, a região estuarina próxima à foz do rio Doce permanece como a área mais sensível e vulnerável, tanto pelos efeitos iniciais mais severos quanto pela persistência de pressões ambientais ao longo do tempo. Ressalta-se, contudo, a necessidade de uma análise mais aprofundada das condições no setor de Abrolhos. Embora este setor apresente, em média, menores densidades fitoplanctônicas e melhor integridade fisiológica, foi observada uma tendência de declínio na diversidade específica da comunidade, o que pode indicar impactos sutis e cumulativos ainda não completamente compreendidos. Conclui-se que a comunidade fitoplanctônica da área monitorada pelo PMBA/Fest-UFES continua sujeita a perturbações ecológicas relevantes, demandando vigilância contínua e estratégias de gestão adaptativa.

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-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.

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.; EDVARDSEN, 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.

KIRK, J. T. O. *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*. Cambridge University Press, 401p. 1986.

KLINDWORTH A.; PRUESSE E.; SCHWEER T.; PEPLIES J.; QUAST C.; HORN M.; GLÖCKNER F.O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation

sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* 2013 Jan 7;41(1):e1. doi: 10.1093/nar/gks808. Epub 2012 Aug 28. PMID: 22933715; PMCID: PMC3592464.

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.

LUND J. W. G.; KIPLING, C. R., LE CREN, E.D. The inverted microscope method of estimating alga number and statistical basis of estimating by counting. *Hydrobiologia*, v.11, p. 143- 170, 1958.

MARGALEF, R. Diversity. In: SOURNIA, A. (Ed.). *Phytoplankton manual*. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle. UNESCO, 1976.

MARIE, D.; PARTENSKY, F.; JACQUET, S.; VAULOT, D. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green-I. *Appl. Environ. Microbiol.* 93:186-193, 1997.

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. Opens external link in new window. Nucl. Acids Res. 41 (D1): D590-D596, 2013.

R CORE TEAM, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <https://www.R-project.org/>.

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 phytoplancton 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 Vervollkommen der quantitativen phytoplankton – methodik. Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol., v.9, p. 1–38. 1958.