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-55/OUT 26

RA2025 PMBA/FEST-UFES

Vitória,

Outubro de 2026

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 Iiboshi 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 11

2.4 ALTERAÇÕES NA MALHA/FREQUÊNCIA AMOSTRAL E ESCOPO REALIZADOS EM OUTUBRO DE 2024: SUAS CONSEQUÊNCIAS NAS ANÁLISES DA SÉRIE HISTÓRICA DE INDICADORES 13

3 RESULTADOS DOS INDICADORES 13

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 a frequência amostrais do Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática da Área Ambiental I (PMBA/Fest-UFES) passaram 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-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 morfologicamente, 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:

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

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 Cytoflex (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 policarbonato, 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 (DECELLE *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 (Cl*a*), e Clorofila b (Cl*b*), Clorofilas *c*1+2 (Cl*c*) 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 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 em 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 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:

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

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);

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

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 predizer 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 detríticas, 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 equabillidade 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 ≥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 espectofotômetro 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.

No presente relatório, não foram incluídos nas análises os dados da estação SDS19, no Setor Foz Sul, a partir de Abril de 2025. Foi verificado pela equipe de campo a presença de embarcação responsável por transporte e descarte de material dragado realizando viagens contínuas entre o canal de acesso de Portocel e uma área de despejo localizada a aproximadamente 1.360 metros da estação SDS19. Após contato com o IEMA, a fim de solicitar informações acerca de atividades licenciadas e executadas nesta área, a instituição enviou o ofício 056/2025-DT/IEMA que indica que atividades ocorrem na região. Após análises mais específicas dos dados, observou-se que a estação SDS19 poderia causar um ruído no monitoramento, por ter influência de outras fontes de alteração. Assim, os temas que coletam na região, incluindo o Fitoplâncton Marinho, não incluíram os dados a partir de Abril de 2025 em suas análises. Considerando a ampla malha amostral e longa série temporal, é de entendimento que não há grandes prejuízos no entendimento da evolução espacial e temporal.

2.4 ALTERAÇÕES NA MALHA/FREQUÊNCIA AMOSTRAL E ESCOPO REALIZADOS EM OUTUBRO DE 2024: SUAS CONSEQUÊNCIAS NAS ANÁLISES DA SÉRIE HISTÓRICA DE INDICADORES

Uma vez que o monitoramento do setor Abrolhos foi descontinuado, no âmbito da Deliberação CIF 803/2024, as análises dos indicadores Índice Ambiental do Fitoplâncton Marinho, Diversidade de Shannon (para as frações iguais e maiores que nanofitoplanctônica) e Diversidade de Hill de ordem 1 (para as frações iguais e menores que a nanofitoplanctônicas) não foram realizadas para as estações amostrais deste setor a partir de outubro de 2024 (Ano 7).

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).

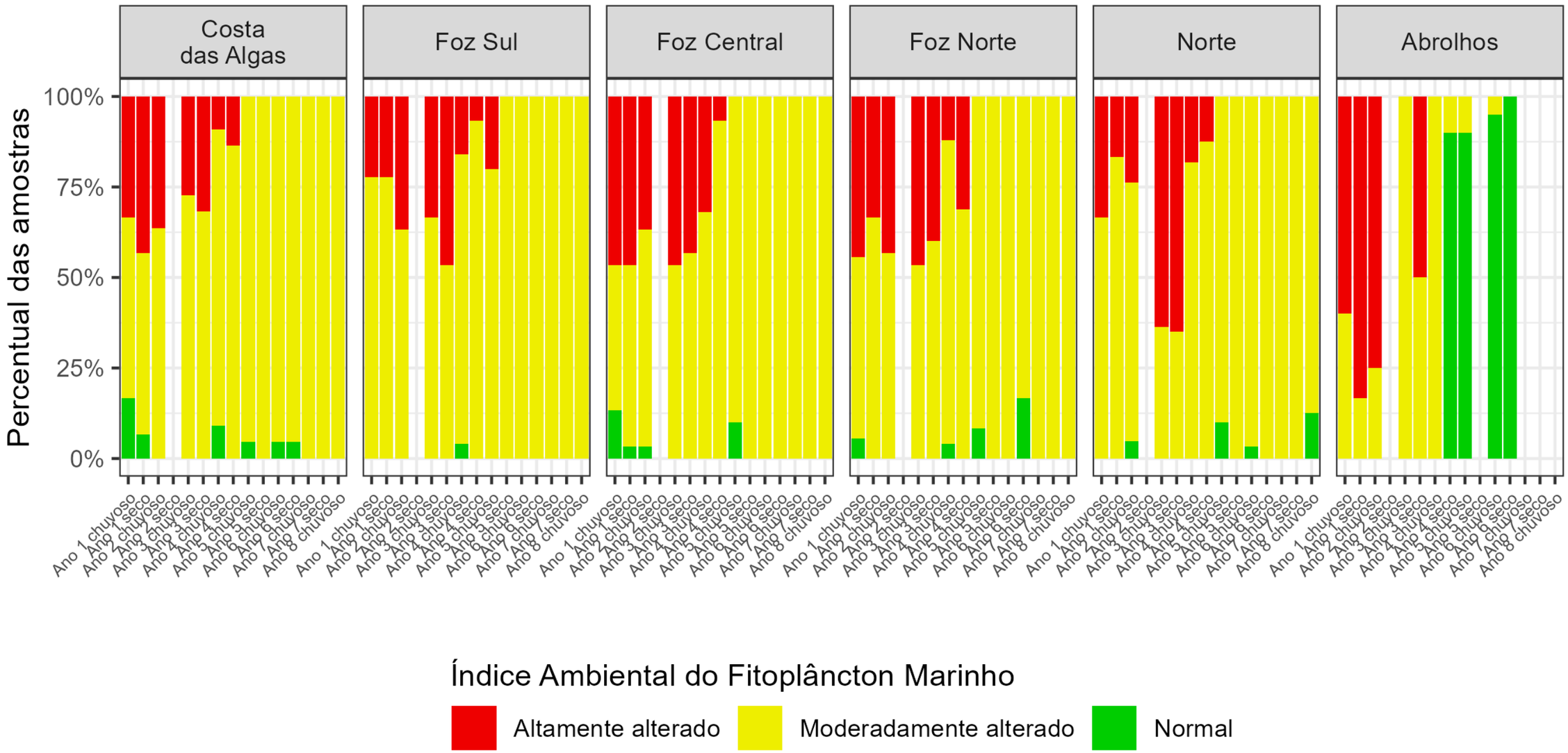
Os indicadores do PMBA/Fest-UFES vêm se consolidando ao longo do monitoramento e, seguindo a proposta estabelecida desde o Relatório Anual de 2022 (RA2022), a apresentação dos resultados será exclusivamente a partir da apresentação dos indicadores, acompanhados de legenda estendida com a explicação de sua variação espaço-temporal de forma mais direta e objetiva.

Para o presente relatório, vale considerar que, durante a campanha amostral de abril de 2025, foi registrada atividade contínua de transporte e disposição de material dragado entre o canal de acesso da Portocel e uma área de despejo situada a aproximadamente 360 m da estação SDS19. Diante da possibilidade de interferência sobre as condições ambientais e os resultados do monitoramento, a FEST encaminhou ao IEMA o Ofício CE GP nº 173/2025 (05 de agosto de 2025), sendo respondida por meio do Ofício nº 056/2025-DT/IEMA (27 de agosto de 2025), que confirmou o histórico de utilização da região para atividades de dragagem e disposição de sedimentos desde o ano 2000. Posteriormente, no Ofício CE GP nº 24/2026 (20 de março de 2026), a FEST oficializou as alterações relevantes encontradas nos resultados da estação SDS19.

Considerando o comportamento discrepante observado nos resultados da estação SDS19, a possível influência das atividades de dragagem e a necessidade de garantir um tratamento homogêneo entre os Temas do Ambiente Marinho do PMBA/Fest-UFES, cujos resultados também contemplam essa estação, a Coordenação do Ambiente Marinho deliberou pela desconsideração dos dados da SDS19 obtidos a partir de abril de 2025 no RA2025. Essa medida visa preservar a consistência metodológica e a comparabilidade das análises.

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), Ano 7 (outubro/2024 a setembro/2025) e Ano 8 (outubro/2025 a março/2026) 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 Setor Abrolhos deixou de ser monitorado a partir do Ano 7, no âmbito da Deliberação CIF 803/2024.



* Devido às adequações na classificação das coletas do fitoplâncton em Abrolhos, os resultados apresentados para Ano 5 Seco no RSE 2025 são apresentados para o Ano 5 Chuvoso. Ainda, não são apresentados resultados a partir do Ano 7 para Abrolhos, considerando a Deliberação CIF 803/2024.

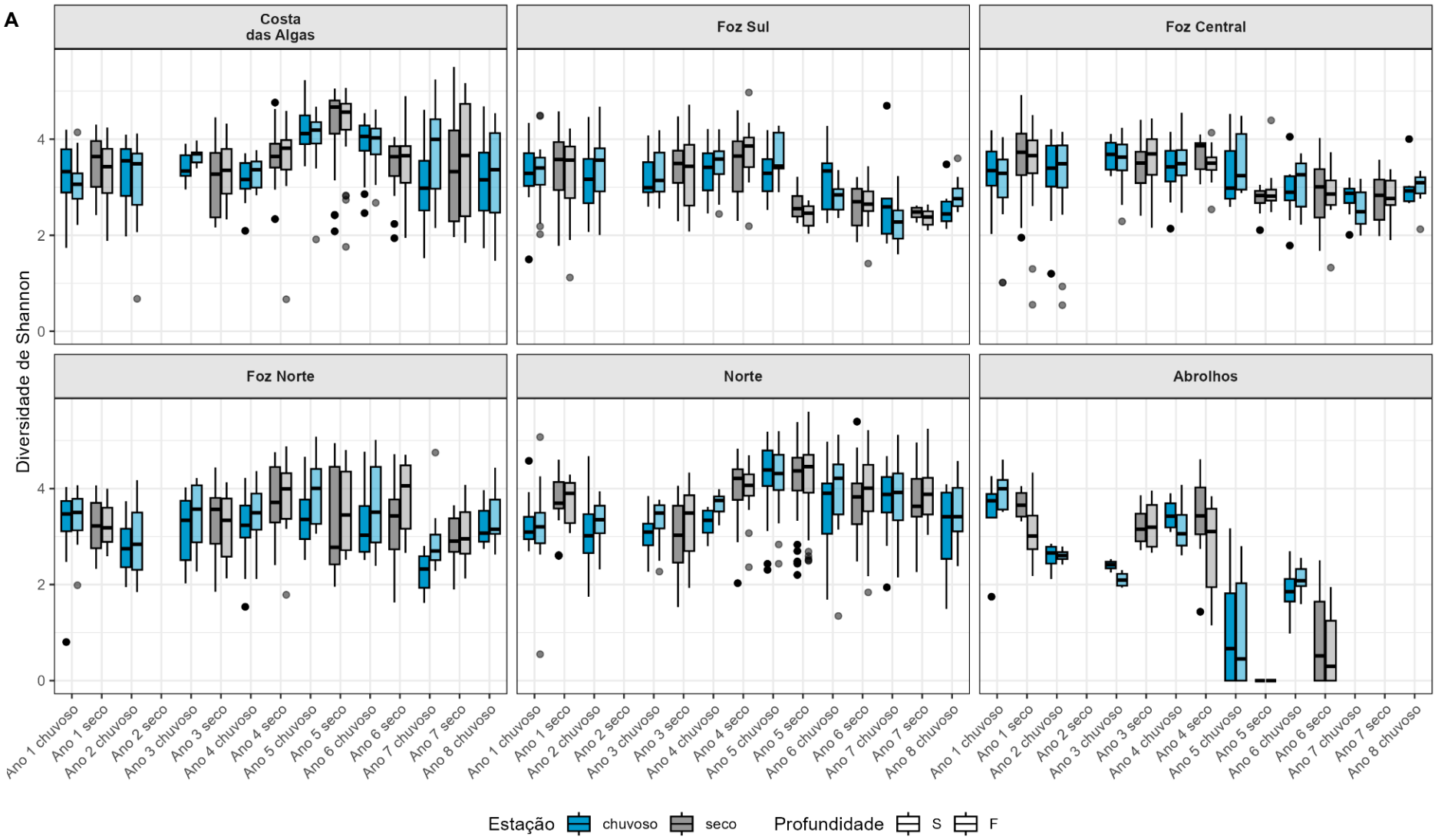
A análise temporal do Índice Ambiental do Fitoplâncton Marinho demonstra, no contexto geral, uma queda gradativa na proporção de amostras categorizadas como Altamente Alteradas durante todo o ciclo de monitoramento. Desde a campanha seca do Ano 5, não houve mais registros desse grau máximo de alteração, com a maior parte dos dados se enquadrando na condição Moderadamente Alterada. O declínio na frequência do status Altamente Alterado fica evidente desde o Ano 3 na totalidade dos setores analisados, com exceção das áreas Norte e Foz Sul, onde essa redução se iniciou apenas no Ano 4. O setor Abrolhos exibiu a recuperação mais significativa, passando a ter prevalência de amostras com classificação Normal desde a estação seca do Ano 4. Mesmo que esse estado ecológico positivo também tenha sido notado nas outras regiões, tratou-se de eventos isolados e sem uma distribuição espacial clara, prevalecendo nessas áreas as comunidades fitoplanctônicas classificadas como Moderadamente Alterado.

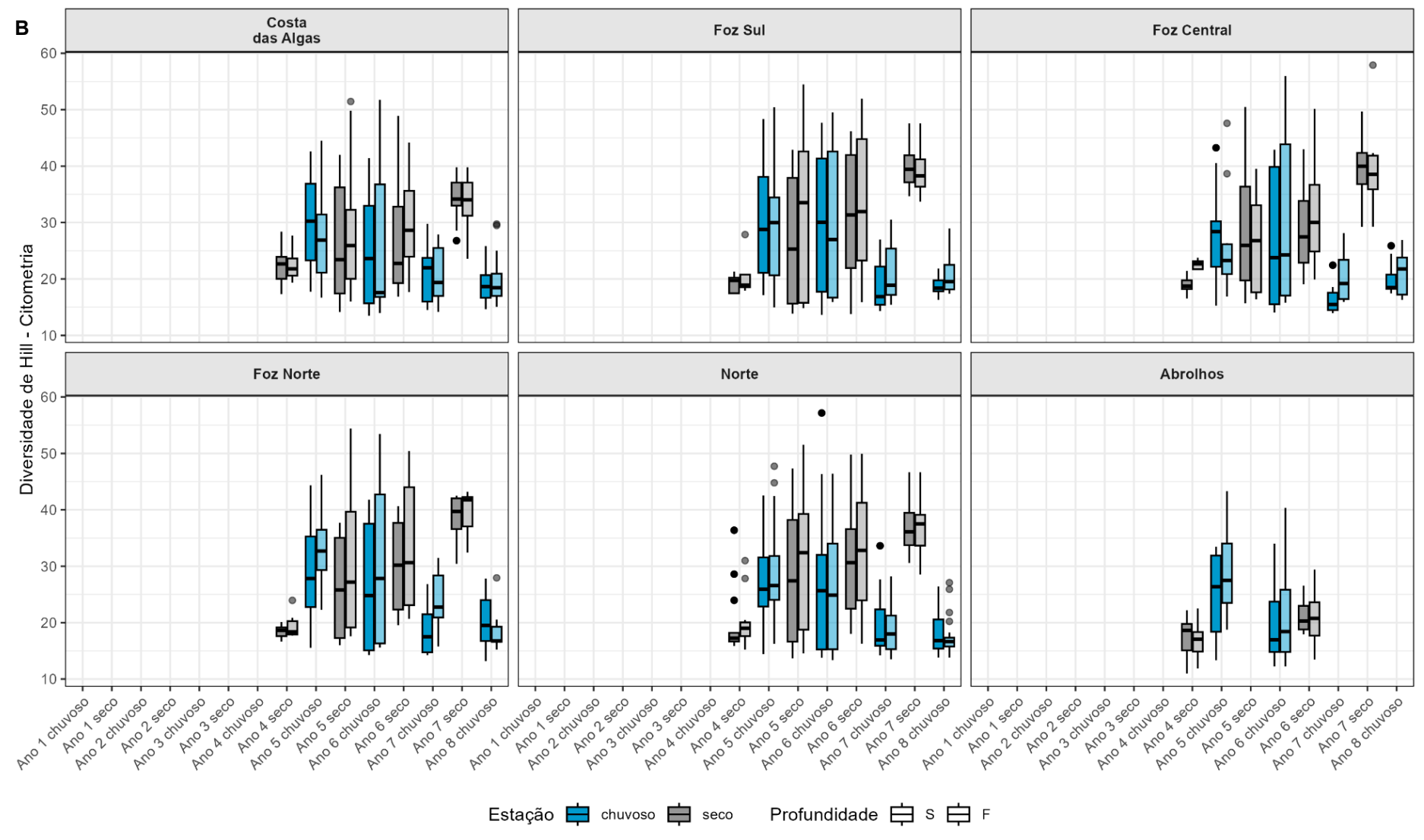
A partir do período chuvoso do Ano 7, somente o setor Norte (especificamente na campanha chuvosa do Ano 8) obteve amostras classificadas como Normal. Por outro lado, o setor Foz Sul exibiu a ocorrência mais duradoura de comunidades Altamente Alteradas, sugerindo uma resistência mais forte à melhoria ambiental nessa porção costeira. Por fim, ao realizar uma avaliação de curto prazo, correspondente ao intervalo entre a estação seca do Ano 7 e a chuvosa do Ano 8, não foram notadas mudanças relevantes no Índice Ambiental do Fitoplâncton, o qual segue apontando impacto de nível moderado na grande maioria dos setores acompanhados.

Ambientes categorizados como Altamente Alterados distinguem-se por abrigarem comunidades fitoplanctônicas com fisiologia comprometida — o que se nota pelos níveis reduzidos de clorofila ativa —, em combinação com uma expressiva densidade de células. O declínio das atividades fotossintéticas aponta para um estágio avançado de senescência populacional, prejudicando a produção primária e gerando impactos negativos diretos nas teias alimentares marinhas. Esse déficit fisiológico pode ser o resultado de variáveis ambientais desfavoráveis ao desenvolvimento do fitoplâncton, a exemplo da escassez de nutrientes, flutuações drásticas de temperatura e salinidade, ou mesmo a exposição a compostos tóxicos. Em contrapartida, a grande abundância de organismos pode sinalizar a ocorrência de florações lideradas por um grupo restrito de espécies oportunistas. Esses táxons, geralmente mais resistentes ao estresse ambiental, possuem o potencial de modificar profundamente o metabolismo do ecossistema, por exemplo, uma queda acentuada do oxigênio dissolvido durante a noite em função das altas taxas de respiração. Somado a isso, tal cenário pode evidenciar um processo de exclusão competitiva de microalgas mais sensíveis, acarretando a simplificação da estrutura da comunidade. Caso essa conjuntura persista, pode-se estabelecer um regime estável alternativo, no qual a assembleia ecológica estagna em um patamar de diversidade empobrecida e funcionamento deficiente. Nesses casos, o retorno a um estado de equilíbrio exige intervenções de manejo específicas ou a ocorrência de uma perturbação natural de grande magnitude. Desse modo, a melhora contínua deste indicador ao longo do tempo sinaliza a existência de resiliência ecológica, atestando a aptidão do sistema marinho para recobrar sua complexidade e funcionalidade plena após sofrer um impacto.

3.2 DIVERSIDADE

Figura 2: Variação da (A) Diversidade de Shannon, para as frações iguais e maiores que nanofitoplanctônica, e (B) Diversidade de Hill de ordem 1 (diversidade específica = exponencial de Shannon), para as frações iguais e menores que a nanofitoplanctônicas, 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), Ano 7 (outubro/2024 a setembro/2025) e Ano 8 (outubro/2025 a março/2026), sendo representado em cinza o período seco Ze em azul o período chuvoso. Entre abril/2020 e novembro/2020 ocorreu suspensão das atividades devido à pandemia da Covid-19. O Setor Abrolhos deixou de ser monitorado a partir do Ano 7, no âmbito da Deliberação CIF 803/2024. 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.





* Devido às adequações na classificação das coletas do fitoplâncton em Abrolhos, os resultados apresentados para Ano 5 Seco no RSE 2025 são apresentados para o Ano 5 Chuvoso. Ainda, não são apresentados resultados a partir do Ano 7 para Abrolhos, considerando a Deliberação CIF 803/2024.

O índice de diversidade de Shannon avaliado para as frações nano e micro do fitoplâncton exibe, de modo geral, um padrão estável até o Ano 4. Durante o Ano 5, nota-se uma elevação nesses índices, seguida por um declínio que se estende até o Ano 7, atingindo patamares inferiores aos registrados no começo do monitoramento. Nas áreas da Foz (Sul, Central e Norte), verificou-se uma tendência ao aumento da diversidade a partir do período chuvoso do Ano 7. Contudo, a dinâmica temporal variou de forma distinta entre as diferentes regiões avaliadas ao longo do estudo. Na região da APA Costa das Algas/REVIS Santa Cruz, ocorreu um pico na diversidade no período seco do Ano 5, com a mediana mais elevada de toda a série histórica (aproximadamente 4,5 bits.organismo-1), seguido de relativa estabilização a contar do período seco do Ano 6. Um comportamento análogo foi notado no setor Norte. Entretanto, a redução nos índices de diversidade nessa área foi mais branda se comparada à da APA Costa das Algas/REVIS Santa Cruz, ocorrendo de maneira mais progressiva até o período chuvoso do Ano 8. Em contrapartida, as áreas da Foz não exibiram esse mesmo pico de elevação, especialmente nos setores Foz Central e Foz Sul. Nesses locais, contabilizaram-se quedas expressivas a partir do período seco do Ano 5, culminando, no período chuvoso do Ano 7, com as medianas mais baixas já medidas para a Foz desde o início do monitoramento. Após esse marco temporal, os setores da Foz passaram a demonstrar uma trajetória de aumento na diversidade, movimento que se mostrou mais intenso no setor Foz Norte. Já o setor Abrolhos registrou, desde o período chuvoso do Ano 5, os índices mais baixos de todo monitoramento (frequentemente inferiores a 2,0 bits.organismo-1), apresentando uma elevação no período chuvoso do Ano 6, e posterior queda no período seco do mesmo ano.

A diversidade de Hill de ordem 1, calculada a partir de parâmetros citométricos das células (com predominância do pico e nanofitoplâncton), passou a integrar o monitoramento a partir do período seco do Ano 4. Os resultados desta análise revelam tendências iniciais similares àquelas observadas para a diversidade de Shannon. No entanto, registra-se uma elevada variabilidade nas leituras dentro dos períodos (secos ou chuvosos) de cada ano, com destaque para o período seco do Ano 5 e o chuvoso do Ano 6. A partir do período chuvoso do Ano 7, nota-se que essa variabilidade se torna mais reduzida. Em todos os setores avaliados (exceto Abrolhos, que foi descontinuado), verifica-se uma queda nos índices de diversidade no período chuvoso do Ano 7, seguida por um aumento no período seco do mesmo ano e uma subsequente redução no período chuvoso do Ano 8. Esses comportamentos divergem dos padrões verificados para a fração de maior tamanho do fitoplâncton, o que sugere, nesta etapa, a ocorrência de um efeito individualizado sobre a diversidade em função do tamanho do fitoplâncton.

A redução da diversidade fitoplanctônica é fortemente influenciada por distúrbios ambientais, que podem inclusive atuar como o principal agente causador desse declínio (POLISHCHUK, 1999). Geralmente, as espécies de maior sensibilidade são rapidamente levadas à extinção local, restando no ambiente apenas as populações mais tolerantes aos estressores. Esse filtro ambiental promove a simplificação da comunidade e a consequente queda na diversidade específica. O declínio da diversidade tem o potencial de afetar a oferta e a qualidade alimentar para os níveis tróficos superiores. Isso ocorre não obrigatoriamente por alterações na biomassa, mas pela dominância de organismos que possuem mecanismos de defesa antipredação — tais como liberação de toxinas, espinhos ou

compostos químicos —, prejudicando a eficiência da transferência de energia ao longo da teia trófica. Além disso, assembleias fitoplanctônicas menos diversas costumam exibir menor resiliência, ficando mais suscetíveis a perturbações subsequentes, de caráter natural ou antrópico. Tal fragilidade restringe o potencial de recuperação da comunidade local e interfere em processos ecológicos fundamentais, como a produtividade primária, a ciclagem de nutrientes e a estabilidade geral do ecossistema.

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

A falta de uma linha de base consolidada impõe desafios para caracterizar as condições prévias da comunidade fitoplanctônica na região, seja antes da intrusão do Material Ligado ao Desastre ou de estressores anteriores, a exemplo das mudanças climáticas e uso do solo. Em termos gerais, os achados indicam que a comunidade fitoplanctônica vem passando por transições graduais em direção a um estado de menor impacto. Dentre os setores monitorados, a porção estuarina adjacente à foz do rio Doce continua sendo a zona de maior sensibilidade e vulnerabilidade, refletindo não apenas a severidade dos efeitos iniciais, mas também a continuidade das pressões ambientais. Em suma, a comunidade fitoplanctônica da região acompanhada pelo PMBA/Fest-UFES permanece exposta a distúrbios ecológicos significativos, o que exige um monitoramento constante e a adoção de medidas 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 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 terrigeneous 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. ZurVervolkommung der quantitativen phytoplankton – methodik. Mitt. Int. Verein. Theor. Angew. Limnol., v.9, p. 1–38. 1958.