

ANEXO 3 MARINHO – BENTOS DE SEDIMENTO INCONSOLIDADO

1 METODOLOGIA

1.1 COLETA E TRATAMENTO DE AMOSTRAS

Foram realizadas seis campanhas pelo subprojeto Bentos Marinho de Substrato Inconsolidado. As campanhas são categorizadas como semestrais, compreendendo 41 estações amostrais (Campanhas: novembro/2018, abril/2019, janeiro/2020); ou trimestrais, estas compreendendo 34 estações amostrais (Campanhas: janeiro/2019; julho/2019, outubro/2019). Dessa forma, o monitoramento envolveu 49 estações amostrais categorizadas em cinco setores (Figura S1; Tabela S1). Nas duas primeiras campanhas não houve recuperação de sedimento pelo buscador de fundo para o ponto CA9, devido à constituição do substrato de laterita ou lama fortemente sedimentada. A partir do segundo ano de monitoramento (Campanhas 14 e 16) houve uma redistribuição dos pontos amostrais, com substituição das estações do Setor Sul (Guarapari e Vitória) e remanejamento de estações dos Setores Abrolhos e Costa das Algas para os setores Foz e Norte (Barra Seca, Conceição da Barra e Mucuri - Figura S1; Tabela S1).

As coletas das amostras foram realizadas em substrato inconsolidado por meio do lançamento de amostrador tradicional van Veen, apropriado para este ambiente, com volume de 3 litros. Cada amostra recebeu uma etiqueta com o código do local de coleta, data, profundidade, número sequencial correspondente, observação sobre local/condição de coleta, código da expedição (coletor), seguindo o padrão estabelecido para o projeto RRDM.

No momento da chegada do amostrador a bordo, para cada pegada, foi apoiado no interior das bandejas plásticas e retirada as alíquotas para as análises de densidade, geoquímica e sedimentologia dos subprojetos de Sedimentologia e Hidrogeoquímica. Na sequência, as amostras para a análise de bentos foram transferidas para sacolas plásticas dispostas uma dentro da outra (duplas) com a etiqueta colocada entre elas. Foi então adicionado às sacolas um volume de formalina 4% suficiente para cobrir o sedimento coletado e fechadas com elástico (de dinheiro). Estas amostras foram mantidas em bombonas e transportadas para os laboratórios da Labinmar na UFES Alegre, ES e Labmacro na UFRB, Cruz das Almas, BA.

Em laboratório, estas amostras tiveram o volume total medido, separado em 3 alíquotas e lavadas em peneiras granulométricas de 0,5 mm e 0,63 µm para separação da fauna bentônica. O volume de cada alíquota foi medido, sendo triado até 300ml de cada amostra. Os organismos foram então triados, quantificados e identificados em grandes grupos taxonômicos (Filo, Classe ou Ordem). Os grupos mais abundantes, Mollusca, Polychaeta e Crustacea foram enviados para taxonomistas para identificação até a categoria taxonômica basal possível, ao menos até o nível de Família.

As metodologias de análise dos dados são apresentadas nos itens a seguir.

Figura S1: Mapa amostral do subprojeto Bentos de Substrato Inconsolidado. Cores nas estações amostrais identificam os setores do monitoramento.

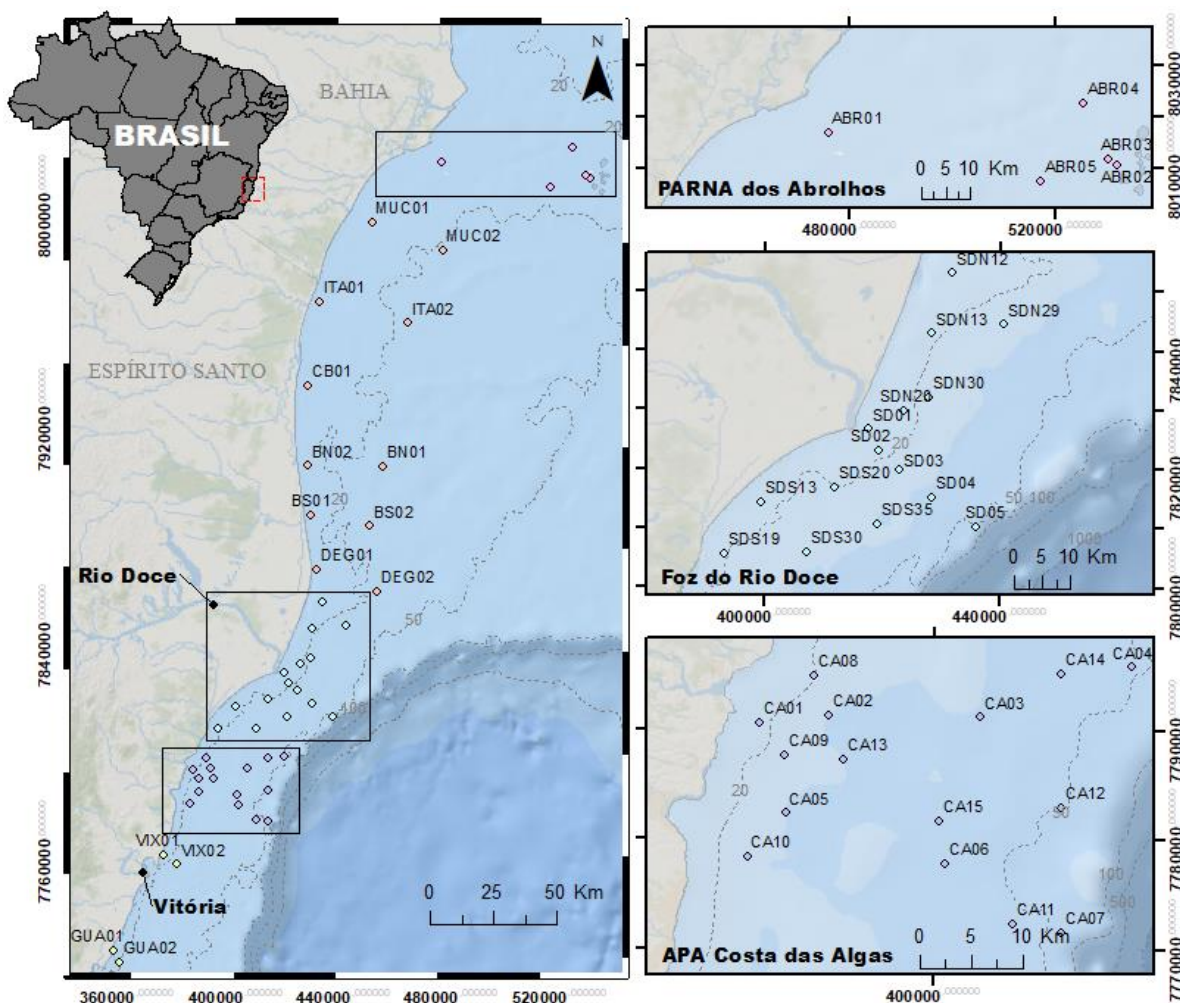


Tabela S1: Identificação das estações amostrais por setor e referências geográficas de cada estação, em Graus Decimais.

SETOR	CÓDIGO DA ESTAÇÃO	LATITUDE	LONGITUDE
Costa das algas	CA01	-19,97758	-40,10831
	CA02	-19,97219	-40,04811
	CA03	-19,97383	-39,91531
	CA04	-19,93261	-39,78258
	CA05	-20,0525	-40,086248
	CA06	-20,09384	-39,94634
	CA07	-20,15107	-39,84459
	CA08	-19,93917	-40,06083
	CA09	-20,005	-40,08694
	CA10	-20,08822	-40,10188
	CA11	-20,1436	-39,8866
	CA12	-20,0482	-39,8447
	CA13	-20,0082	-40,0349
	CA14	-19,9379	-39,844
	CA15	-20,0592	-39,9518
Foz do Rio Doce	SDN13	-19,50706	-39,68361
	SDN20	-19,62458	-39,72928
	SDN29	-19,49245	-39,56820
	SDN30	-19,60542	-39,68925
	SD01	-19,65317	-39,78639
	SD02	-19,68639	-39,76906
	SD03	-19,71456	-39,73697
	SD04	-19,75786	-39,68278
	SD05	-19,82333	-39,59333
	SDS13	-19,76472	-39,95969
	SDS19	-19,84143	-40,01954
	SDS20	-19,74233	-39,84103
	SDS30	-19,84053	-39,88614
	SDS35	-19,79823	-39,77281
Norte	DEG01	-19,30858	-39,67196
	DEG02	-19,383	-39,45741
	BS01	-19,12345	-39,6876
	BS02	-19,159	-39,48581
	BN01	-18,95867	-39,7015
	BN02	-18,96185	-39,4344
	CB01	-18,69022	-39,70328
	ITA01	-18,408	-39,6585
	ITA02	-18,47849	-39,34523
	MUC01	-18,13886	-39,47154

SETOR	CÓDIGO DA ESTAÇÃO	LATITUDE	LONGITUDE
	MUC02	-18,23369	-39,22198
Abrolhos	ABR01	-17,93486	-39,22722
	ABR02	-17,99172	-38,69711
	ABR03	-17,98172	-38,71508
	ABR04	-17,88414	-38,75972
	ABR05	-18,02028	-38,83772

1.2 SELEÇÃO DAS VARIÁVEIS ABIÓTICAS E COMPOSIÇÃO DAS MATRIZES AMBIENTAL, DE CONTAMINANTES ORGÂNICOS E METAIS E MATRIZ DE VARIÁVEIS ESPACIAIS.

Para monitorar e entender de forma mais refinada os processos que ocorrem nas comunidades bentônicas em toda a extensão da malha do PMBA, torna-se necessário integrar dados bióticos das comunidades e os dados abióticos do meio. Integrar os dados a comunidade bentônica com as variáveis do ambiente foi necessário, para isso, primeiro, foi preciso avaliar o comportamento de inúmeras variáveis abióticas na região estudada. As variáveis avaliadas dizem respeito ao monitoramento dos subprojetos de Hidrogeoquímica e Sedimentologia, ambos do Anexo três, uma vez que as estações de coletas delineadas para o estudo do subprojeto Bentos de Substrato Inconsolidado é um subconjunto dos subprojetos citados anteriormente. Foi necessário realizar análises focadas nas estações congruentes entre eles.

Alguns compostos contaminantes orgânicos não foram incluídos priori das análises por não apresentarem variação ao longo do tempo e do espaço. Entre os dez compostos Pesticidas cinco foram excluídos a priori: DeltaHCH, GamaHCH (Lindano), Endrin, Alfaclordano, Gamaclordano e entre os Esteróis: Estigmastanol e Colestenol. O conjunto de variáveis referentes aos Contaminantes Emergentes (e. g. Ibuprofeno etc.), Aminas e Fenóis também foram analisados e por não apresentarem variações não foram incluídos nas análises.

Em seguida foram avaliadas as correlações entre as diferentes variáveis dentro do mesmo grupo de compostos: Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PHAs), Pesticidas e Esteróis e PCBs. Quando encontrada correlação acima de 80% a variável de menor significância biológica (baseado na literatura) foi removida. Desta forma, reduzimos o montante de variáveis sem perder informação substancial. Dos HPAs foram removidas cinco variáveis: Acenftaleno, Fenantreno, Pireno, Criseno, Bz(k)fluoranteno e para os Esteróis também foram removidas cinco variáveis: Epicoprostanol, Coprostanona, Campesterol, Lanosterol e Estigmasterol. Ao final, compõem a matriz de contaminantes orgânicos 20 variáveis, das quais três são referentes aos Pesticidas, oito aos esteróis e nove aos PHAs, além dos Hidrocarbonetos totais e PCBs totais.

Tabela S2: Composição da Matriz de contaminantes orgânicos usada nas análises do subprojeto de Bentos de Substrato
Inconsolidado, Anexo 3.

PESTICIDAS	HIDROCARBONETOS	PCBS	HPAS	ESTERÓIS
DDT	Hidrocarbonetos totais	PCBs totais	Acenafteno	Coprostanol
DDD			Fluoreno	Diidrocolesterol
DDE			Antraceno	Brassicasterol
			Benzo(A)Antraceno	Sitostanol
			Benzo(A)Pireno	Dinosterol
			Indeno(1,2,3cd)Pireno	Colesterol
			Benzo(G,H,I)Perileno	B-sitosterol
			Acenafteno	

Para compor a matriz de contaminantes metais (inorgânicos), utilizou-se dos dados produzidos pelo subprojeto de Hidrogeoquímica e sedimentologia. Foram utilizados quatorze metais como variáveis em análises, todos pertencentes à fração parcial: Vanádio (V), Cobalto (Co), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Arsênio (As), Prata (Ag), Cádmio (Cd), Bário (Ba), Chumbo (Pb), Crômio (Cr), Ferro (Fe), Alumínio (Al), Manganês (Mn) e Zinco (Zn). O ferro foi incluído na matriz para balizar a variância, mas não foi utilizado em nenhuma das análises a seguir.

A matriz ambiental foi constituída de variáveis sedimentológicas principalmente: Matéria orgânica (MO), Nitrogênio e Carbono elementares, percentuais de Silte-Argila, carbonato de cálcio (CaCO₃), Colesterol e B-sitosterol, que são correlacionados como matéria orgânica de origem, continental e marinha, respectivamente. Duas variáveis foram provenientes de amostras da água de fundo, rente ao sedimento superficial: Feopigmentos e Clorofila ativa. Adicionalmente, variáveis granulométricas como tamanho médio do grão e grau de seleção também compuseram a matriz ambiental, ambos em escala métrica.

A matriz espacial formada a partir dos Mapa de autovetores de Moran (Moran eigenvector maps, MEMs) (Legendre & Legendre 2012). MEMs são variáveis lineares que representam todas as configurações possíveis de autocorrelação espacial. Cada são componentes extraídos de uma matriz de vizinhança gerada com as coordenadas geográficas de cada estação do projeto.

1.3 ANÁLISE DE DADOS

O processamento de todas as amostras foi concluído, porém devido à pandemia de COVID 19 e todas as suas consequências, a identificação dos principais grupos (Annelida, Mollusca e Crustacea) para o segundo ano ainda não foi concluída. Portanto, métricas da estrutura de comunidades, como riqueza e diversidade, que precisam de um refino taxonômico, serão apresentadas até o ano 1, bem como a análise da estrutura multivariada deste mesmo ano. Outra métrica univariada de comunidades, a abundância, que não necessita de identificação na maior resolução possível, foi analisada ao longo do primeiro e do segundo ano, bem como a estrutura multivariada da comunidade à nível de grandes grupos faunais.

Para investigar a variabilidade na abundância de organismos, na riqueza e diversidade de espécies, ao longo das campanhas, dos setores e das profundidades, nós utilizamos modelos lineares generalizados mistos (BOLKER et al., 2009), ajustados com distribuição negativa binomial para riqueza e abundância de espécies, utilizando o volume de cada amostra, que variou independentemente, como fator aleatório. O Critério de Akaike corrigido (AICc), pontuação de máxima verossimilhança e o Peso de Akaike (AICw) foram utilizados para inferência dos modelos (BURNHAM & ANDERSON, 2002). Nós apenas selecionamos modelos com $AICc < 2$. Isto é uma prática considerada conservadora na rotina de inferência de vários modelos (BURNHAM & ANDERSON, 2002). Antes da seleção dos modelos foi retirada a autocorrelação espacial, utilizando a matriz gerada a partir das coordenadas das estações, aplicando a função *errorsar* do pacote *spdep*.

Devido a montante de variáveis das diferentes matrizes, foi realizada seleção das variáveis em duas etapas, na primeira, através de uma Análise de Componentes Principais e foram extraídos os componentes de cada matriz abiótica que concentraram ao menos 80% da variação da matriz, em seguida fizemos uma seleção de modelos com estes componentes. Na segunda etapa selecionamos as variáveis que mais contribuíram para o componente selecionados na primeira etapa. Após essa seleção inserimos as variáveis abióticas nos modelos. Esta estratégia é de extrema importância para que se evite saturação dos modelos.

Para as análises de riqueza e diversidade de espécies, utilizamos 6 componentes da matriz ambiental (chamados aqui de “amb”) (Figura S1.D), cinco da matriz de metais (“met”) (Figura S2.C) e X componentes da matriz de contaminantes orgânicos (“cont”) (Figura S3). Para a riqueza de espécies foram selecionados o amb 1 e 3 e os met 1 e 5, e as variáveis incluídas no modelo para a riqueza de espécies foram $CaCO_3$, Nitrogênio, Carbono, Grau de seleção, Silte-argila, B-sitosterol (Figura S1.A.C), Pb, V, Ba, Al, Ni, Cr, Mn (Figura S23.A.B). Para a diversidade de espécies foram selecionados os componentes amb 1, amb 2 e met 1 e met 5, e as variáveis utilizadas para o modelo com a diversidade de espécies foram $CaCO_3$, Nitrogênio, Carbono, Grau de seleção, Silte-argila, MO, Colesterol (Figura S2.B), Pb, V, Ba, Al, Ni, Cr, Mn (Figura S2.A.B).

Para a análise da abundância foram utilizados os dois anos de monitoramento, portanto uma nova Análise de Componentes Principais foi realizada. Foram utilizados quatro componentes da matriz ambiental (Figura S4.C), quatro da matriz de metais e mais 5 da matriz de contaminantes (Figura S5.C).

Desta etapa foram selecionados os componentes selecionados os componentes amb1, amb3, cont1, cont2 e met1. As variáveis utilizadas para a análise da variabilidade da abundância foram CaCO_3 , Grau de seleção, Silte-argila, MO (Figura S4.A.B), Indeno(1,2,3cd)Pireno, Benzo(G,H,I)Perileno, Fluoreno, DDT, DDD, (Figura S5.A.B) e Pb, V, Ba, Al, Ni.

Usamos o tamanho médio do grão e o ferro (Fe) apenas para caracterização dos ambientes nas Análises de Componentes Principais. Não utilizamos o primeiro devido aos elevados valores de grau de seleção. E o segundo devido aos também devido aos valores elevados, por ser o objeto fim do rejeito. O Fe foi incluído nas Análise de Componentes Principais para balizar a variância dos demais metais.

Também investigamos a relação da variabilidade na riqueza, abundância e diversidade de espécies com a presença e ausência do rejeito de minério da barragem, utilizando o Conjunto Mineralógico do Ferro – IMS – índice produzido pelo subprojeto de Sedimentologia. Investigamos essa relação utilizando regressões logísticas.

Nós usamos Análises Multivariadas por Permutação (PERMANOVA) (ANDERSON, 2001) para investigar a variabilidade das matrizes abióticas entre os setores, campanhas e profundidades. Também usamos PERMANOVA e visualização através de Escalonamento Multidimensional não-Métrico (nMDS), para analisar a estrutura multivariada da comunidade no tempo e no espaço, mas também face a presença do rejeito indicada pelo IMS. Analisamos separadamente esta estrutura para o ano 1 e 2. Para o ano 1 foram utilizados os três táxons mais representativos: Mollusca, Annelida e Amphipoda, que contavam com identificação até nível específico. Neste caso, apesar da identificação em nível específico, optamos por analisar esses dados a nível de família, com o objetivo de captar alguma resposta funcional. Para o segundo, os dados ainda não contavam com o refinamento taxonômico, portanto analisamos a comunidade em nível de grandes grupos, neste caso, todos os grupos já registrados para todo o período do PMBA.

Para inferir a relação entre as variáveis abióticas e a comunidade bentônica foram realizadas Análises de Redundância (RDA) com particionadas variação particionada. As partições delimitadas dizem respeito aos diferentes tipos de variáveis abióticas, ou seja, matriz espacial, ambiental, de contaminantes orgânicos e de metais. Nesta etapa na matriz de metais estava incluído o IMS. Estas análises foram feitas tanto para o ano um utilizando Annelida, Mollusca e Amphipoda a nível de família, quando para o ano um e dois a nível de grandes grupos.

O processo de seleção das variáveis para esta etapa se deu individualmente para cada matriz por *stepwise* (forward). Em seguida as matrizes foram inseridas numa RDA parcial a fim de particionar a variação presente na estrutura multivariada da comunidade, de acordo com as distintas matrizes de variáveis abióticas.

Figura S2: Seleção de componentes e variáveis ambientais. A, B, C ranque das variáveis que mais contribuíram para o amb 1, amb 2 e amb 3 respectivamente; D, Contribuição de cada componente principal da Análise de Componentes Principais para a matriz ambiental.

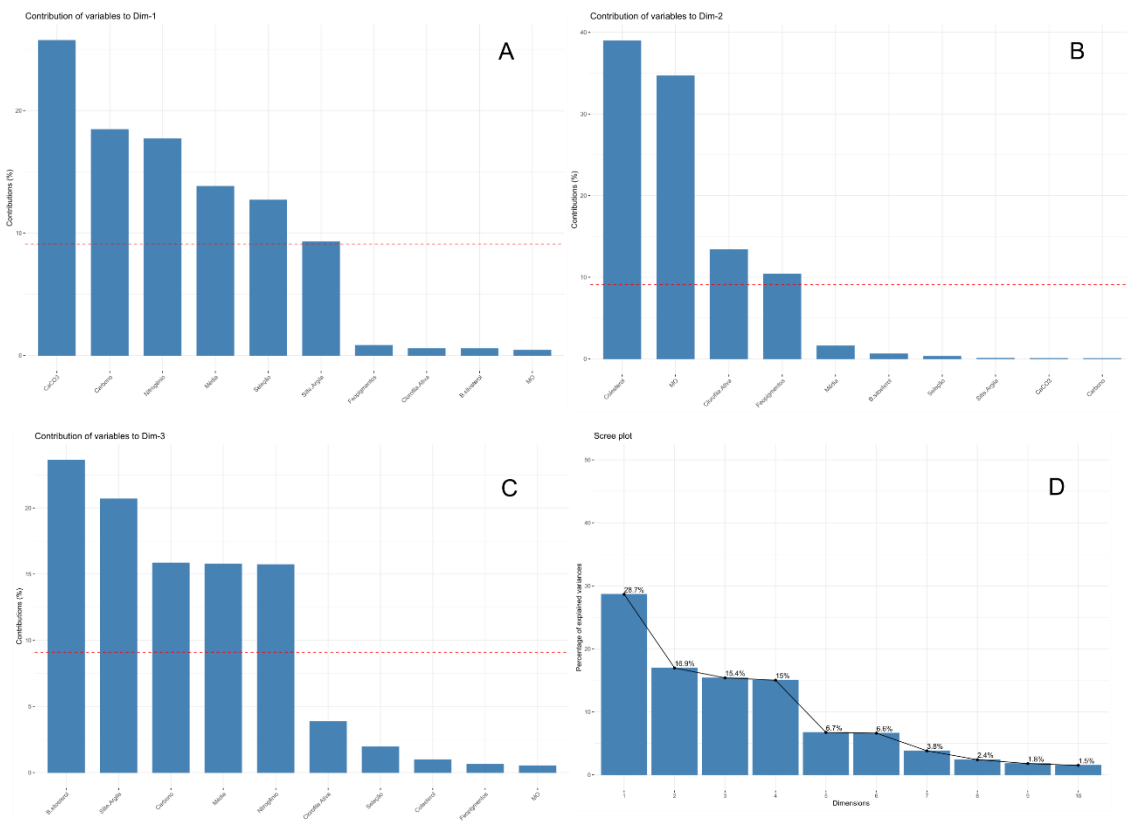


Figura S3: Seleção de componentes e variáveis. A, B ranque das variáveis que mais contribuíram para o met 1 e met 5, respectivamente; C, Contribuição de cada componente principal da Análise de Componentes Principais para a matriz de metais.

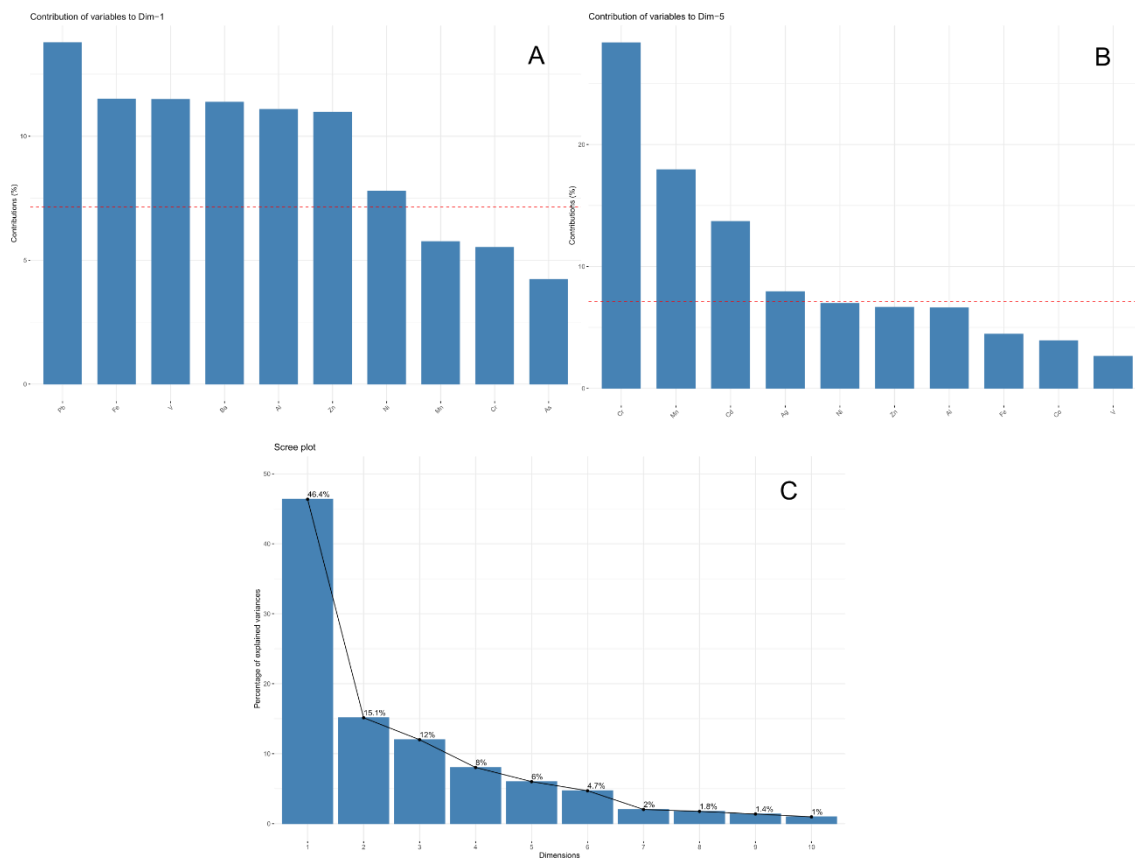


Figura S4: Seleção de componentes. Contribuição de cada componente principal da Análise de Componentes Principais para a matriz de contaminantes orgânicos.

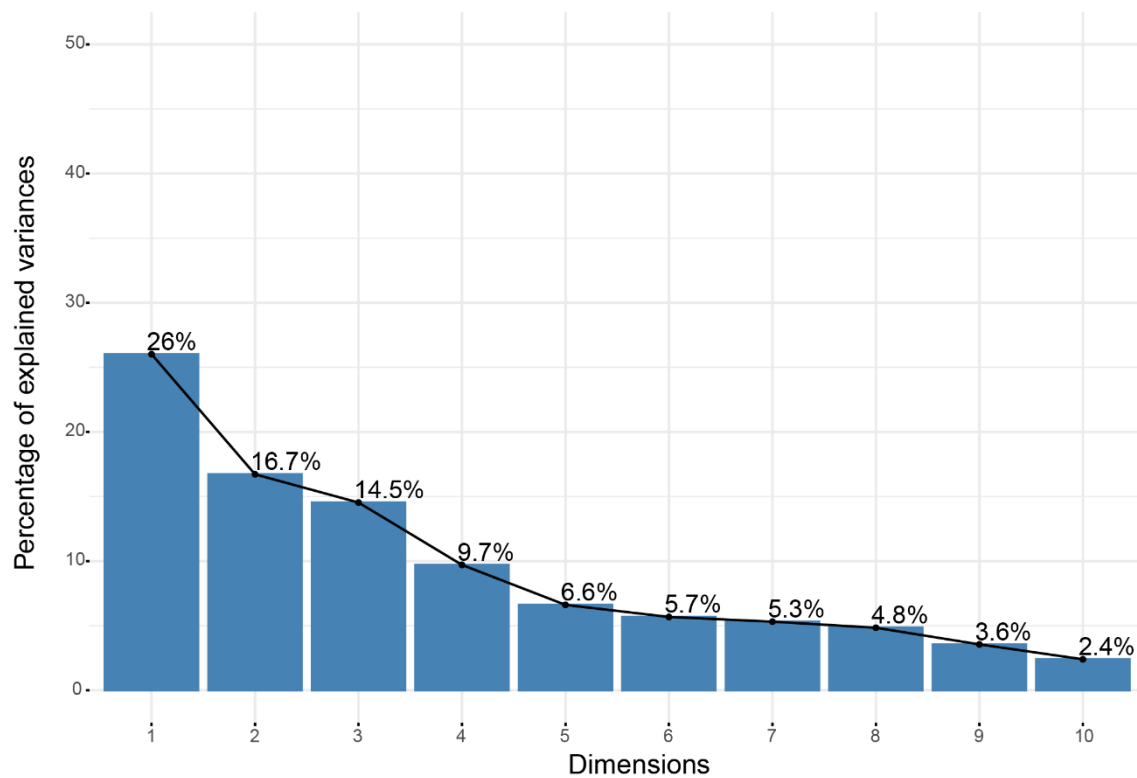


Figura S5: Seleção de componentes e variáveis. A, B ranque das variáveis que mais contribuíram para o amb 1 e amb 3, respectivamente; C, Contribuição de cada componente principal da Análise de Componentes Principais para a matriz ambiental.

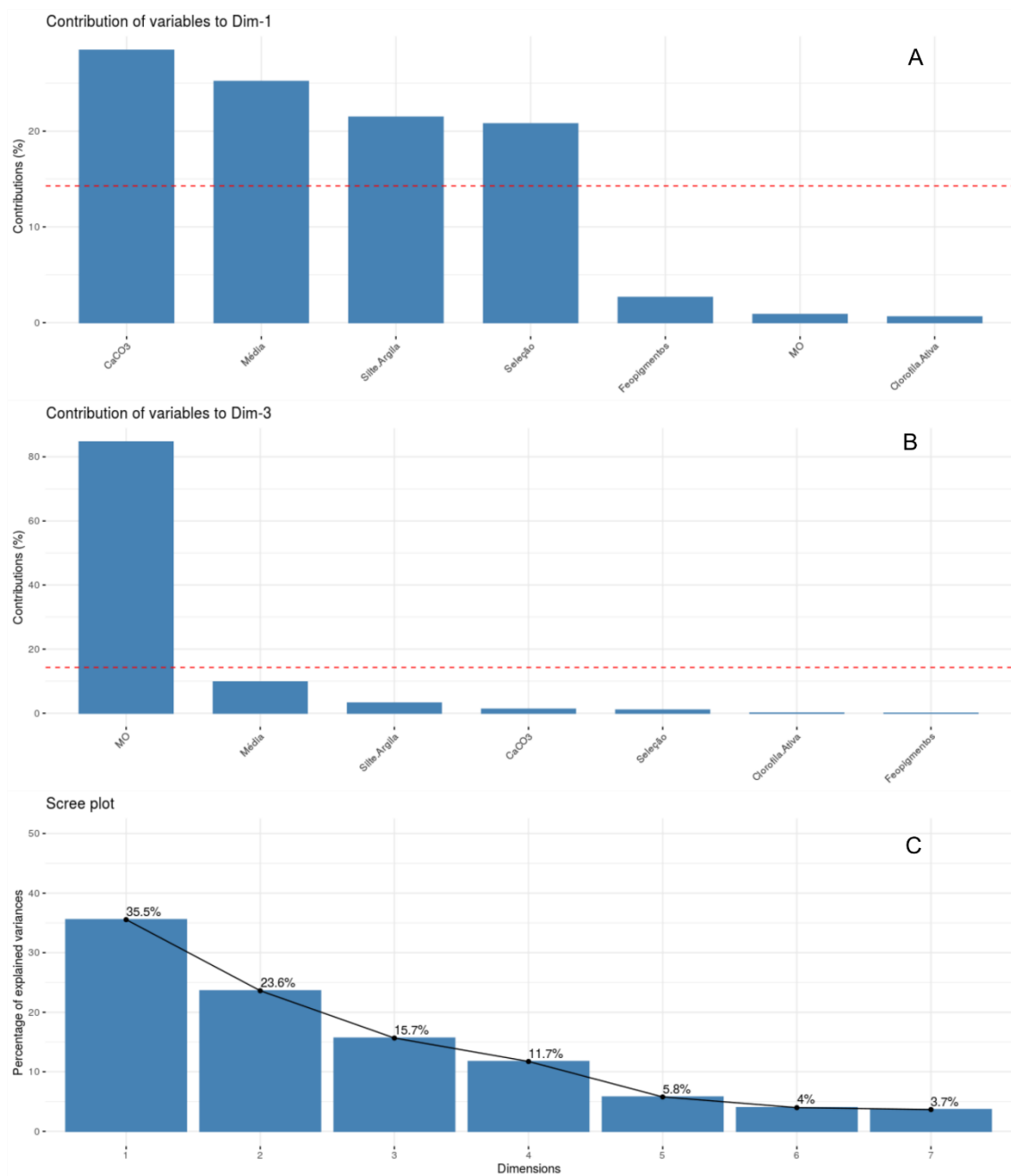


Figura S6. Seleção de componentes e variáveis. A, B ranque das variáveis que mais contribuíram para o cont 1 e cont 2, respectivamente; C, Contribuição de cada componente principal da Análise de Componentes Principais para a matriz de contaminantes orgânicos.

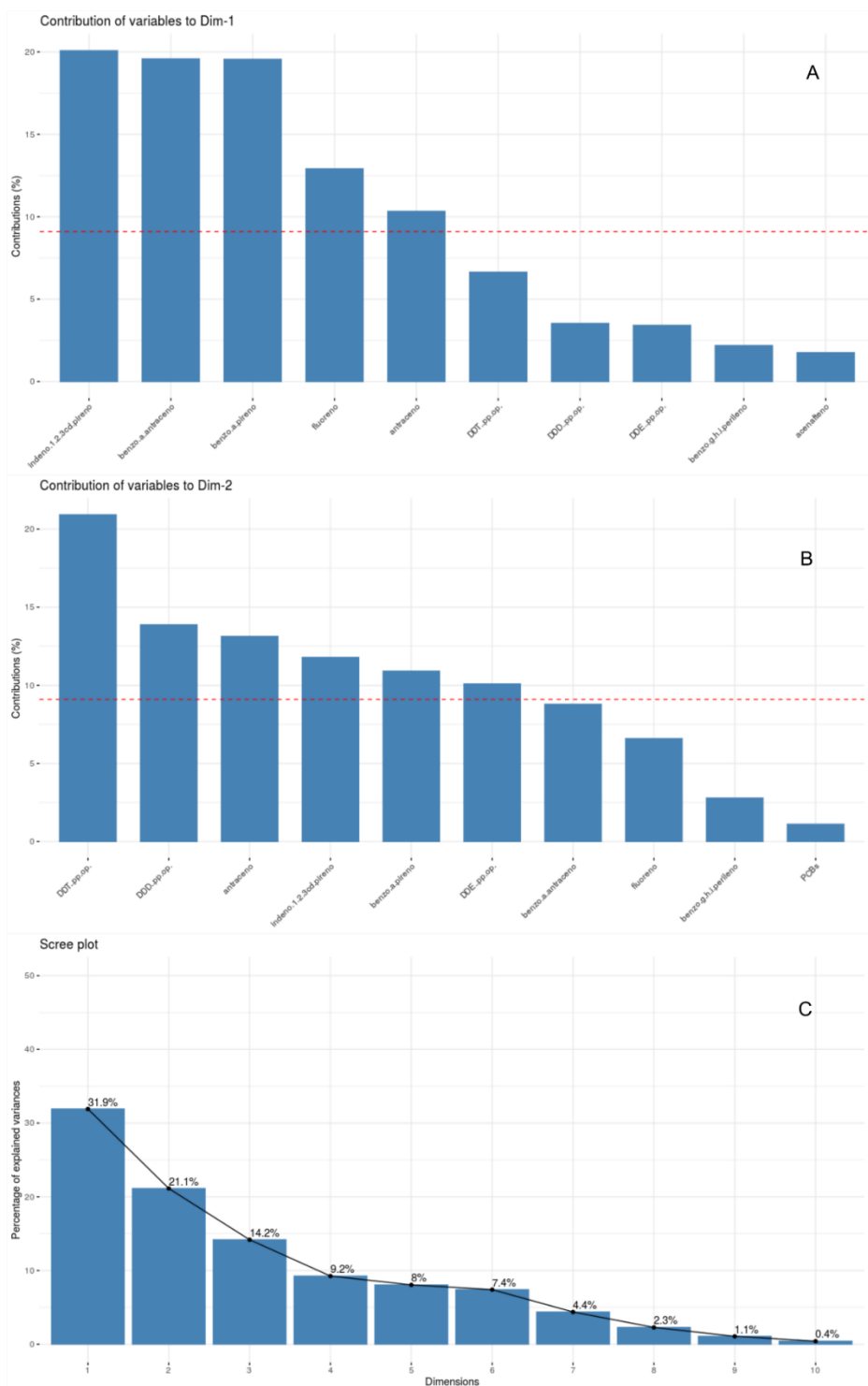


Figura S8: Análise de Componentes Principais para matriz ambiental entre as Campanhas. (%) – Indica a quantidade de variação capturada por cada componente.

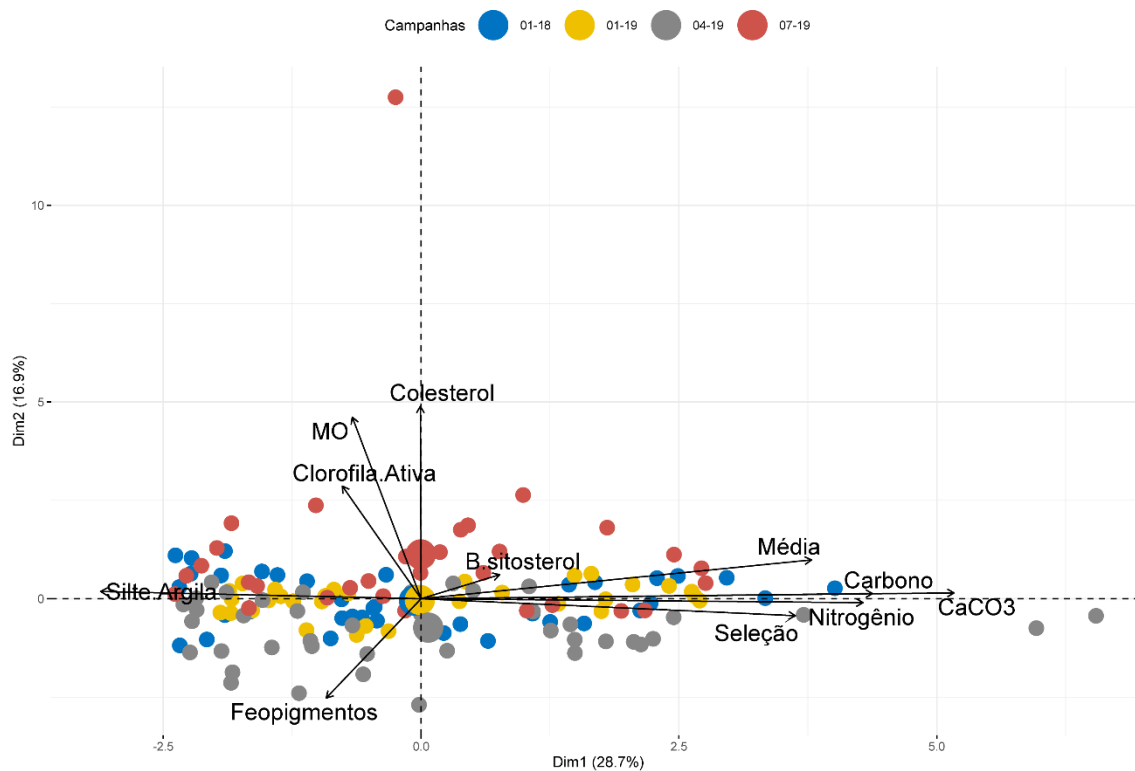
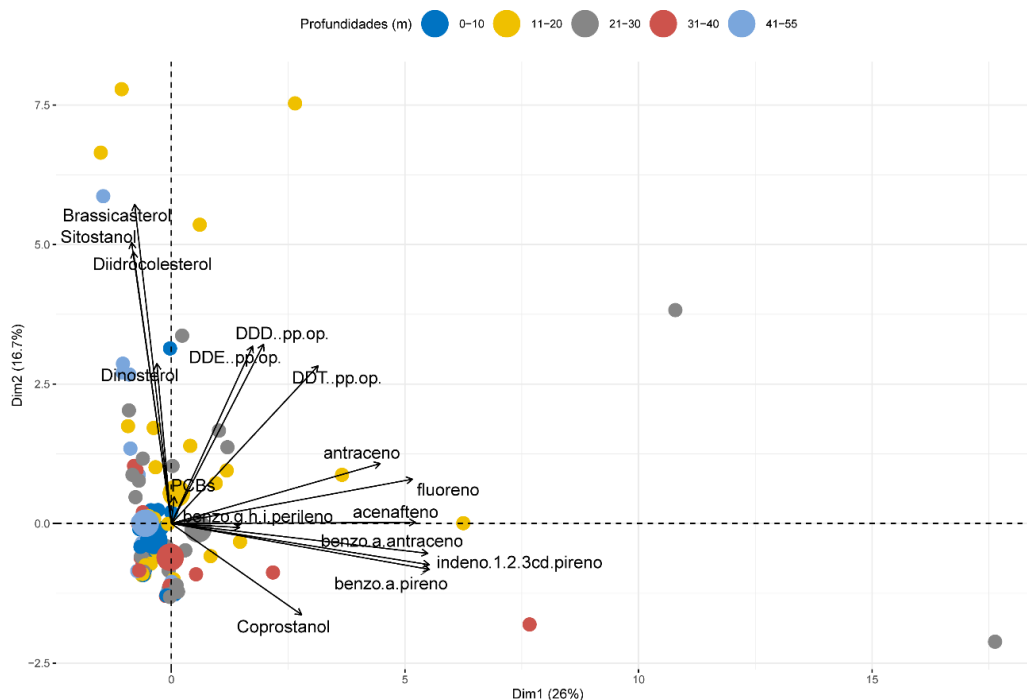


Figura S9: Análise de Componentes Principais para matriz de contaminantes não metais entre as Profundidades. (%) – Indica a quantidade de variação capturada por cada componente.



2 REFERÊNCIAS

BOLKER, B.M., BROOKS, M.E., CLARK, C.J., GEANGE, S.W., POULSEN, J.R., STEVENS, M.H.H., WHITE, J.S.S., **Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology**. 2009.

BURNHAM, K.P., ANDERSON, D.R. **Model Selection and Multimodel Inference: A Practice Information-Theoretic Approach**. Springer, New York. 2002.

BIVAND, R. Spatial dependence: weighting schemes, statistics and models. **R package** version 0.7–7. 2018.

LEGENDRE, P., AND LEGENDRE, L. **Numerical ecology**. Third edition. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. 2012.