

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

A7DS1 – Material Suplementar 1

**Anexo 7 – Dulcícola/ Macroinvertebrados bentônicos/ Ictioplâncton/
Ictiofauna**

RT-39 RRDM/FEV 22

RA2021 PMBA/Fest-RRDM

Vitória,

Fevereiro de 2022

Metodologia Anexo 7 Dulcícola: A7DS1

SUMÁRIO

1	ÁREA DE ESTUDOS	5
1.1	ICTIOFAUNA E MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS	5
1.2	ICTIOPLÂNCTON	9
2	COLETA DE DADOS	13
2.1	COLETA DE MACROINVERTEBRADOS	13
2.2	COLETA DE ICTIOPLÂNCTON	16
2.2.1	Amostragem em lagoas marginais e remanso	18
2.3	COLETA DE ICTIOFAUNA	19
3	ANÁLISE DE DADOS	23
3.1	MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS	23
3.1.1	Composição de estrutura da comunidade de macroinvertebrados	23
3.1.2	Avaliação de deformidades no aparelho bucal (mento) de larvas de Chironomidae	25
3.2	ICTIOPLÂNCTON	26
3.3	ICTIOFAUNA DULCÍCOLA: ECOLOGIA	27
3.3.1	Estrutura e dinâmica das populações de ictiofauna	27
3.3.2	Composição e estrutura da comunidade de ictiofauna	27
3.3.3	Ecologia Trófica	30
3.3.4	Biologia Reprodutiva	31
3.3.5	Padrões de ocorrência e proposta de espécies tolerantes e intolerantes ao ambiente afetado pelo rejeito de minério	32
3.4	ICTIOFAUNA DULCÍCOLA: AVALIAÇÃO GENÉTICA	33
3.4.1	DNA Barcode	33
3.4.2	Genética de populações	34
3.4.3	Marcadores Microssatélites	34
3.4.4	Genes Mitocondriais e Nucleares	37

3.4.5	Diversidade filogenética.....	38
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Lista de figuras

Figura 1: Localização dos pontos de monitoramento da ictiofauna e macroinvertebrados bentônicos. Círculos vermelhos representa pontos de coleta na calha do Rio Doce, amarelos representam os córregos e azuis os lagos. A identificação e localização dos pontos segue TR4 para o PMBA/Fest-RRDM, Cláusula 165.....	6
Figura 2: Fotos dos pontos de amostragens da ictiofauna dulcícola e macroinvertebrados bentônicos. P01, P01B, P02, P03, P04, P08 e P08B são referentes ao ambiente calha do Rio Doce: P05, P06 e P10, são lagos; P07 e P09, são córregos. Ver Tabela 1 e Figura 1 para identificação e localização dos mesmos. Para o ponto 02 são apresentadas duas imagens que representam a dinâmica do Rio Doce no período chuvoso e seco.	7
Figura 3: Localização geográfica dos pontos de amostragem do monitoramento do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo.....	10
Figura 4: Localização geográfica das lagoas marginais amostradas durante o monitoramento do ictioplâncton dulcícola do Ano 3, no Baixo Rio Doce, Espírito Santo.	11
Figura 5: Fotos dos pontos de amostragem do monitoramento do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo.....	12
Figura 12: Processo de triagem (a) e identificação dos macroinvertebrados bentônicos (b).....	14
Figura 13. Tipos de amostradores utilizados para a coleta de macroinvertebrados bentônicos nos trechos lóticos e lênticos do baixo Rio Doce.....	14
Figura 8: Procedimentos de amostragem do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo. a) fluxômetro; b) amostragem sobre barco; c) amostragem sobre ponte; d) amostra fixada e acondicionada em pote plástico.	17
Figura 9: Triagem das amostras obtidas no monitoramento do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo. a) disposição em bancada e b) separação dos ovos e larvas de peixes sob estereomicroscópio.	17
Figura 10: Procedimentos de amostragem de juvenis em lagoas marginais e remanso durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo. a) tarrafa; b) rede de arrasto; c) peneirão; d) exemplares da ictiofauna capturados.....	18
Figura 11: Processo de identificação dos juvenis coletados nas lagoas marginais e remanso durante o Ano 3, baixo rio Doce, Espírito Santo. a) identificação de características morfológicas e b) verificação de listas taxonômicas.	19

Figura 6: Petrechos de coleta utilizados nas amostragens de ictiofauna. (a) rede de espera; (b) rede de arrasto; (c) tarrafa; (d) pesca elétrica. 21

Figura 7: Triagem (a), biometria (b), análise de conteúdo estomacal (c) e extração de tecido durante atividade de campo para análise molecular (d). A foto (d) foi tirada antes da pandemia de COVID19. 22

Figura 14: Classificação de deformidades do mentum de larvas de insetos do gênero *Chironomus*. A - Sem dente lateral externo; B – Deformidade medial fraca e C – Deformidade medial severa ou qualquer combinação de fortes deformidades. Figura adaptada de Callisto et al. (2000). 26

Lista de tabelas

Tabela 1: Identificação e coordenadas UTM (SIRGAS 2000 UTM Zona 24S) dos pontos de coleta de ictiofauna e macroinvertebrados bentônicos do ambiente dulcícola. Macroinvertebrados foram amostrados apenas no Ano 2 e Ano 3. 6

Tabela 2: Coordenadas UTM (Zona 24K) dos pontos de amostragem do monitoramento do ictioplâncton dulcícola no Ano 3, no Baixo Rio Doce, Espírito Santo. 11

Tabela 3: Intervalo dos escores das métricas do Índice Biótico Bentônico. 15

Metodologia Anexo 7 Dulcícola

1 ÁREA DE ESTUDOS

1.1 ICTIOFAUNA E MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

Durante o Ano 1 do PMBA/Fest/RRDM (outubro de 2018 a setembro de 2019), foram realizadas amostragens mensais em cinco pontos na calha do Rio Doce na porção capixaba, nos lagos do Óleo e do Limão e no córrego Palmas, que drena a lagoa Palminhas (Figura 1), conforme indicados no Termo de Referência 4 para o Programa de Monitoramento da Biodiversidade Aquática, Cláusula 165 (TR4). Durante o Ano 2 e Ano 3, as amostragens continuaram sendo mensais (tendo a concordância da CT-Bio e Fundação Renova conforme Nota Técnica nº 15/2020/CTBio/DIBIO/GABIN) e compreenderam o período entre novembro de 2019 e setembro de 2021, sendo que entre fevereiro e dezembro de 2020 as atividades de campo foram suspensas devido à pandemia do COVID19. As atividades de campo foram retomadas no Ano 3 e foram executadas entre dezembro de 2020 e setembro de 2021, respeitando todos os protocolos de prevenção à COVID19. Durante a campanha de março de 2021 (campanha 20), a pandemia de COVID19 avançou muito no Espírito Santo e as equipes que estavam em campo foram orientadas a suspender as atividades e retornar para suas sedes. Dessa forma, a campanha de março de 2021 compreende apenas as amostragens realizadas nos pontos 04 (calha do Rio Doce, em Linhares) e 07 (córrego das Palmas, em Linhares). No Ano 2, a malha de amostragens sofreu algumas alterações, aprovadas pela Fundação Renova e CT-BIO. Essas alterações visaram uma caracterização melhor de habitats potencialmente diferentes aos da calha do Rio Doce. Foram adicionados dois pontos: P09 no córrego São Pedro Frio, com características de córregos de pequeno porte e não afetados pelo rejeito de minério e o P10 Lago das Palmas. Na calha do Rio Doce, dois pontos foram realocados: P01 foi transferido para o reservatório de Mascarenhas (P01B) para compreender melhor o efeito do reservatório na assembleia de peixes e macroinvertebrados do Baixo Rio Doce; e, o P08 da calha, foi transferido para um ponto próximo à montante, em razão de condições melhores de acesso (Tabela 1; Figura 1). Na Figura 2 são apresentados registros fotográficos de cada ponto amostrado. Banco de registros fotográficos estão arquivados no Laboratório de Sistemática Molecular, na Universidade Federal de Viçosa (UFV)

Figura 1: Localização dos pontos de monitoramento da ictiofauna e macroinvertebrados bentônicos. Círculos vermelhos representa pontos de coleta na calha do Rio Doce, amarelos representam os córregos e azuis os lagos. A identificação e localização dos pontos segue TR4 para o PMBA/Fest-RRDM, Cláusula 165.

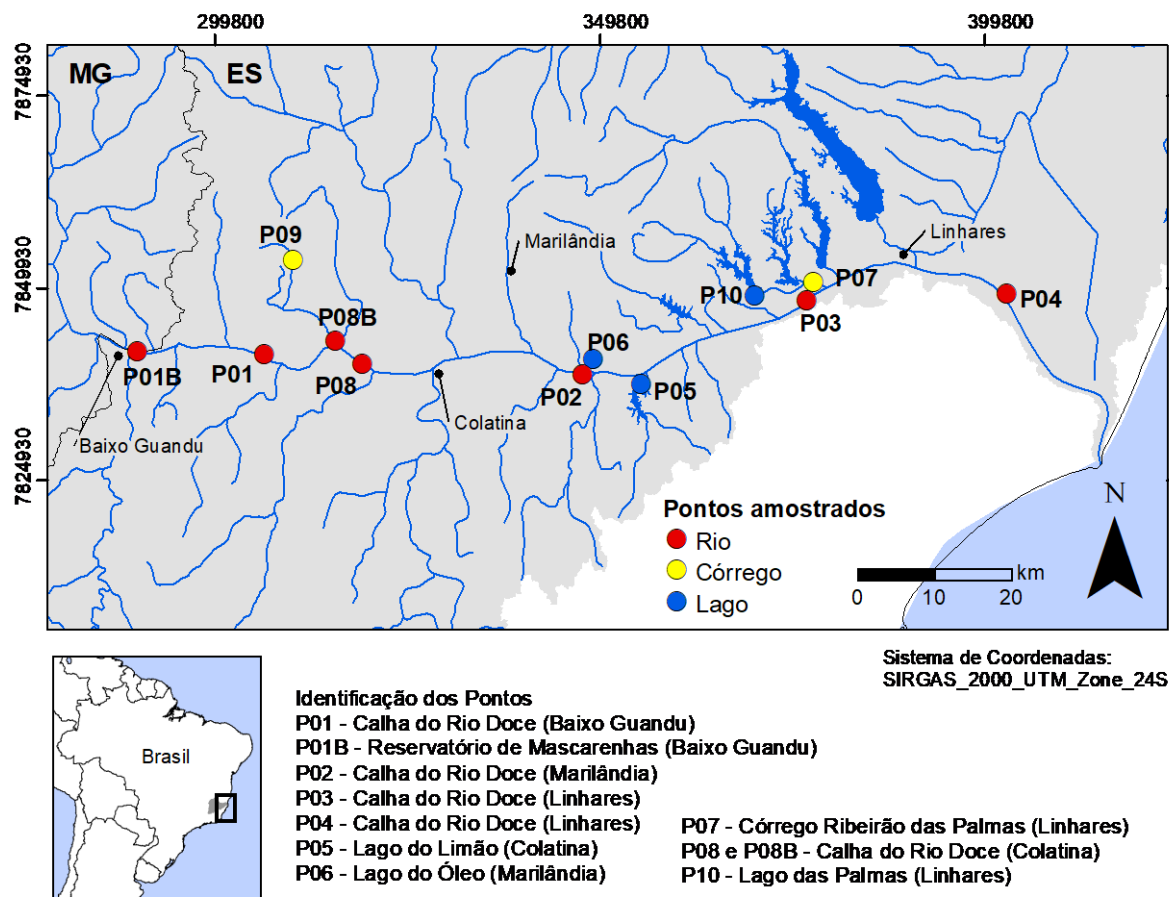


Tabela 1: Identificação e coordenadas UTM (SIRGAS 2000 UTM Zona 24S) dos pontos de coleta de ictiofauna e macroinvertebrados bentônicos do ambiente dulcícola. Macroinvertebrados foram amostrados apenas no Ano 2 e Ano 3.

Ponto	Estado	Município	Localidade	X (UTM)	Y (UTM)
P01*	ES	Baixo Guandu	Rio Doce	306240	7841208
P02	ES	Marilândia	Rio Doce	348378	7839577
P03	ES	Linhares	Rio Doce	376384	7849263
P04	ES	Linhares	Rio Doce	402605	7849080
P05	ES	Colatina	Lago do Limão	355148	7837322
P06	ES	Marilândia	Lago do Óleo	348731	7839743
P07	ES	Linhares	Ribeirão Palmas	377545	7850618
P08*	ES	Colatina	Rio Doce	318993	7840030
P09**	ES	Colatina	Córrego São Pedro Frio	309975	7853420
P10**	ES	Linhares	Lago das Palmas	369855	7848788
P01B**	ES	Baixo Guandu	Rio Doce na barragem de Mascarenhas	289743	7841597
P08B**	ES	Colatina	Rio Doce	318993	7840030

* Coletas realizadas apenas no Ano 1

** Coletas realizadas no Ano 2 e Ano 3

Figura 2: Fotos dos pontos de amostragens da ictiofauna dulcícola e macroinvertebrados bentônicos. P01, P01B, P02, P03, P04, P08 e P08B são referentes ao ambiente calha do Rio Doce: P05, P06 e P10, são lagos; P07 e P09, são córregos. Ver Tabela 1 e Figura 1 para identificação e localização dos mesmos. Para o ponto 02 são apresentadas duas imagens que representam a dinâmica do Rio Doce no período chuvoso e seco.



Figura 2: Continuação.

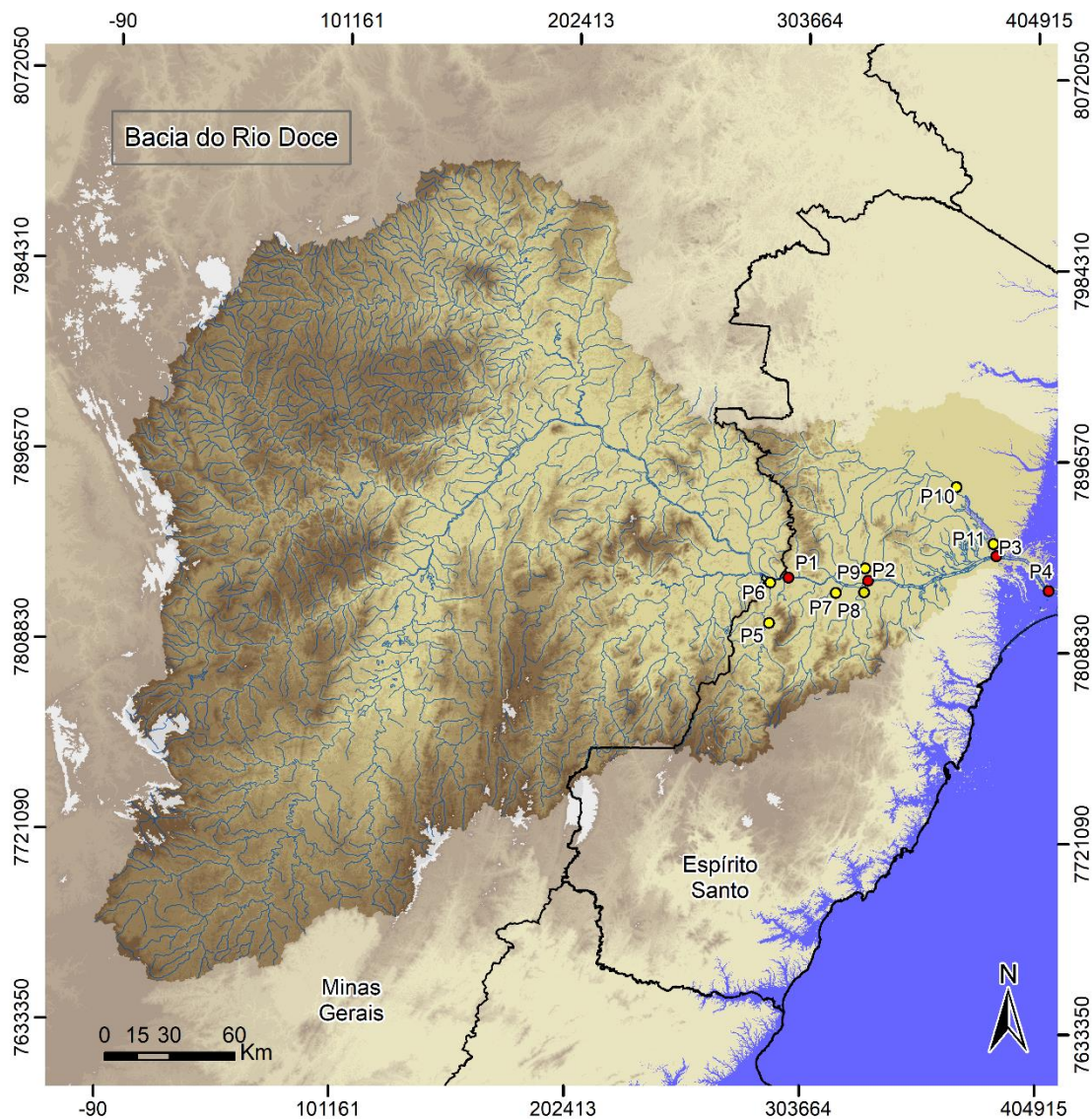


1.2 ICTIOPLÂNCTON

O primeiro monitoramento de ictioplâncton dulcícola foi realizado no Ano 3 do PMBA/Fest-RRDM entre 26 de dezembro de 2020 e 23 de agosto de 2021. As estações de amostragem para o monitoramento do ictioplâncton possuem uma distribuição específica por levar em consideração os locais de desova e à deriva dos organismos. Logo, foram selecionadas onze estações amostrais do Baixo Rio Doce, estado do Espírito Santo, sendo quatro delas localizadas no rio principal, que compreende a área diretamente afetada pelo rompimento da barragem: P1 (montante da UHE Mascarenhas), P2 (Colatina), P3 (Linhares) e P4 (Foz), e outras sete nos principais tributários do baixo rio Doce, considerados como pontos controle (área não afetada): P5 (rio Guandu 1 – porção alta), P6 (rio Guandu 2 – foz), P7 (rio Santa Joana – foz), P8 (rio Santa Maria do rio Doce), P9 (rio Pancas), P10 (rio São José – Montante da lagoa Juparanã) e P11 (rio São José – Jusante da lagoa Juparanã), apresentados na Figura 3**Erro! Fonte de referência não encontrada.**, Figura 5 e Tabela 2.

Além disso, quatro pontos amostrais foram selecionados em áreas marginais (lagos e lagoas), com o objetivo de verificar uma possível relação das lagoas naturais do baixo rio Doce com o processo de recrutamento das espécies migradoras nativas da bacia. Para isso, foram realizadas amostragens qualitativas nos lagos do Limão e das Palmas, e nas lagoas Nova e Monsaraz a fim de verificar a presença de juvenis de tais espécies utilizando esses ambientes como local de crescimento (Figura 4, Figura 5 e Tabela 2).

Figura 3: Localização geográfica dos pontos de amostragem do monitoramento do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo.



Sistema de Coordenadas:
SIRGAS_2000_UTM_24S



Identificação dos Pontos

- P1. Rio Doce – Montante Mascarenhas
- P2. Rio Doce – Colatina
- P3. Rio Doce – Linhares
- P4. Rio Doce – Foz
- P5. Rio Guandu (1)
- P6. Rio Guandu (2)
- P7. Rio Stª Joana
- P8. Rio Stª Maria
- P9. Rio Pancas
- P10. Rio São José (Montante)
- P11. Rio São José (Jusante)

- Rio Doce (área afetada)
- Afluentes (ponto controle)
- Rede hidrográfica



Figura 4: Localização geográfica das lagoas marginais amostradas durante o monitoramento do ictioplâncton dulcícola do Ano 3, no Baixo Rio Doce, Espírito Santo.

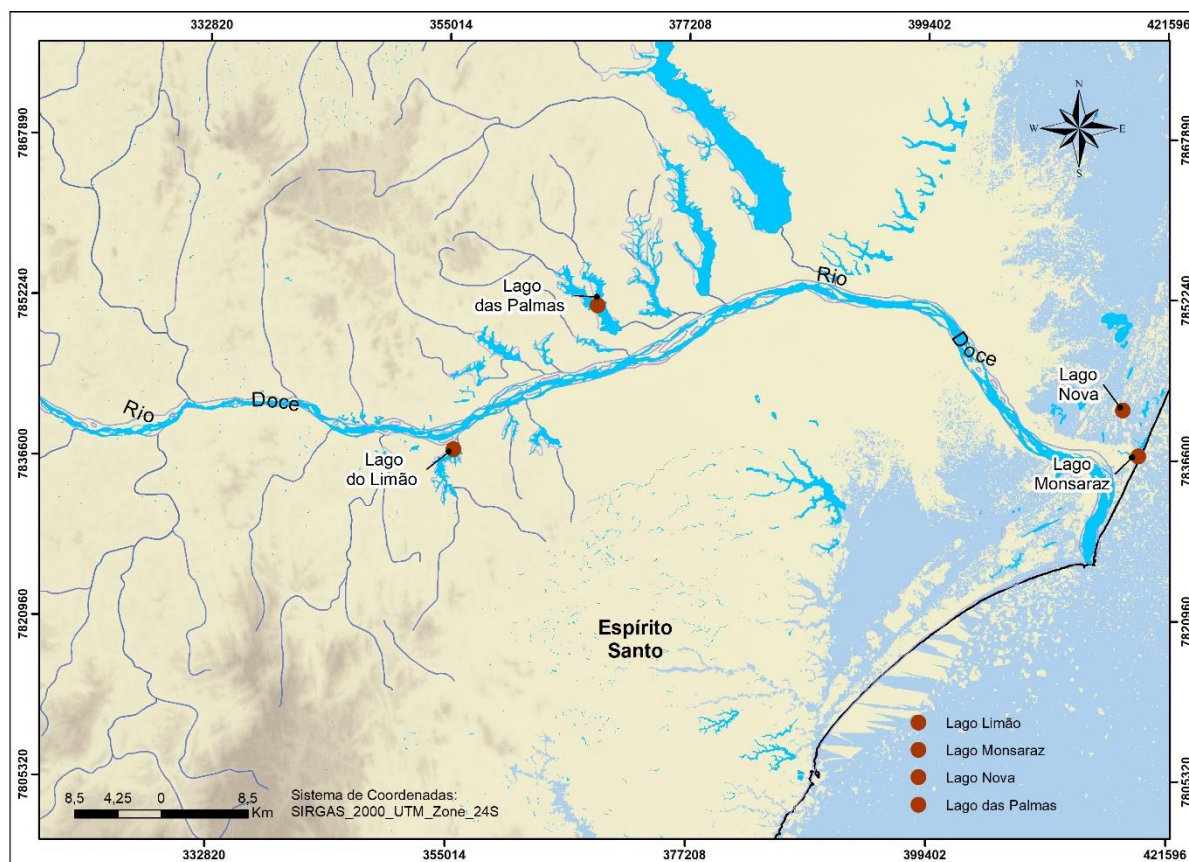


Tabela 2: Coordenadas UTM (Zona 24K) dos pontos de amostragem do monitoramento do ictioplâncton dulcícola no Ano 3, no Baixo Rio Doce, Espírito Santo.

Ponto	Estado	Município	Localidade	X (UTM)	Y (UTM)
P1	ES	Baixo Guandu	Rio Doce	296585	7842605
P2	ES	Colatina	Rio Doce	331320	7841467
P3	ES	Linhares	Rio Doce	387144	7853249
P4	ES	Regência	Rio Doce	410025	7837308
P5	ES	Baixo Guandu	Rio Guandu	288711	7840200
P6	ES	Penha	Rio Guandu	288333	7821572
P7	ES	Colatina	Rio Santa Joana	317241	7835732
P8	ES	Colatina	Rio Santa Maria do Rio Doce	329597	7836144
P9	ES	Colatina	Rio Pancas	330078	7847185
P10	ES	Linhares	Rio São José	369488	7884768
P11	ES	Linhares	Rio São José	385901	7858733
P12	ES	Linhares	Lago do Limão	355561	7837347
P13	ES	Linhares	Lago das Palmas	368830	7851487
P14	ES	Regência	Lago Nova	417521	7841511
P15	ES	Regência	Lago Monsaraz	418992	7837045

Figura 5: Fotos dos pontos de amostragem do monitoramento do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo.

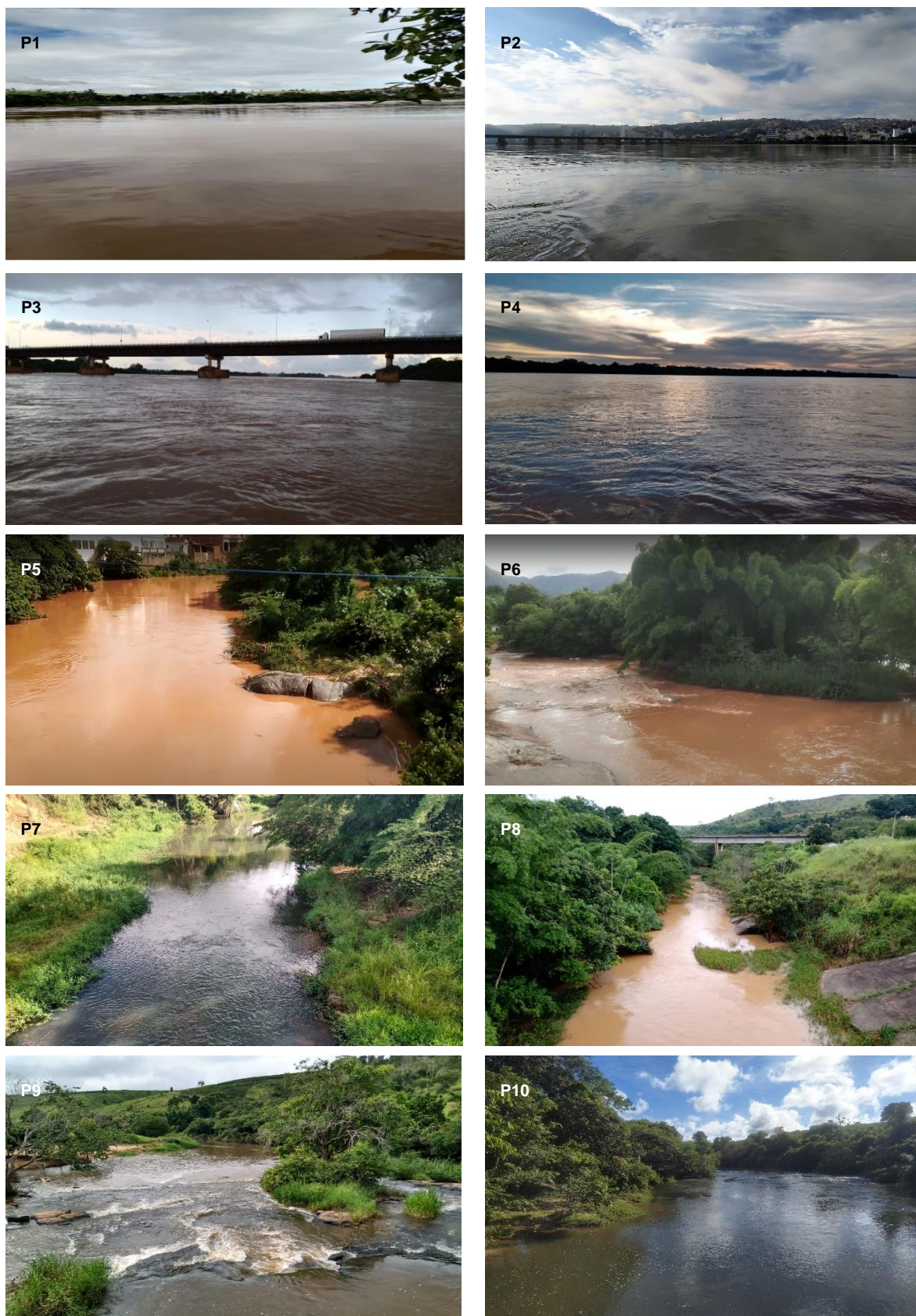
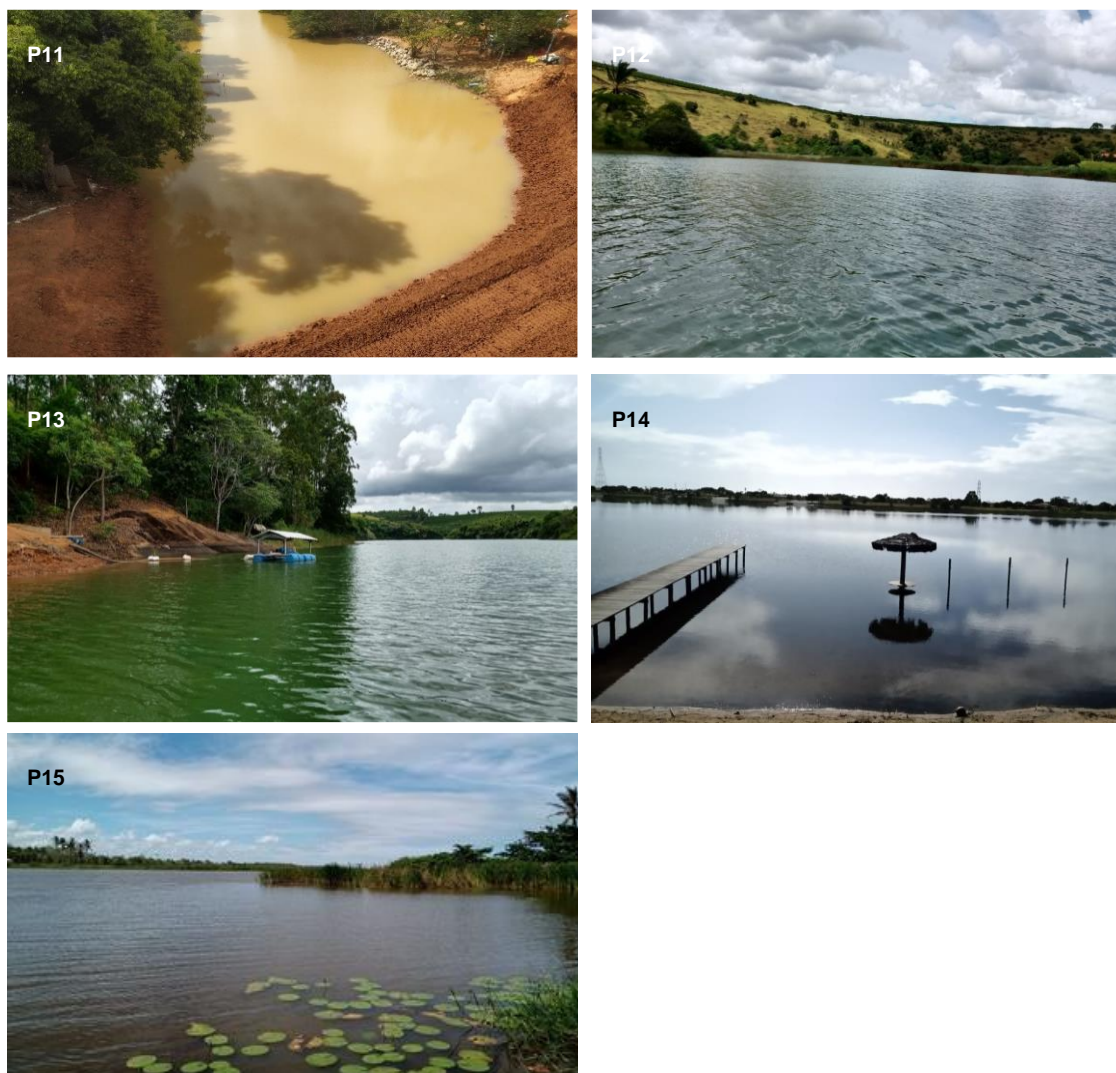


Figura 5: Continuação



2 COLETA DE DADOS

2.1 COLETA DE MACROINVERTEBRADOS

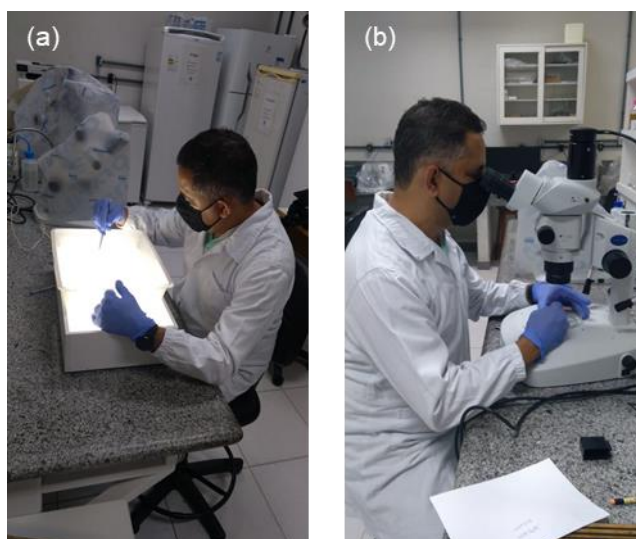
As coletas de macroinvertebrados iniciaram em dezembro de 2019 e programadas para serem realizadas trimestralmente. No entanto, em virtude da suspensão das atividades de campo devido à pandemia da Covid-19, houve alteração no cronograma de coletas preservando a sazonalidade de chuva e seca onde apenas uma coleta foi realizada no período chuvoso de dezembro de 2019 antes das interrupções das atividades e retomadas com a flexibilização das atividades no período chuvoso de em dezembro de 2020. Assim as amostragens de macroinvertebrados foram realizadas nos mesmos pontos da coleta de ictiofauna nos períodos chuvoso de 2019/2020 e período seco de 2021. Em cada ponto amostral foram coletadas no mínimo três amostras de sedimento sempre tentando abranger o maior número de habitats possíveis. Para a coleta foi utilizado um amostrador do tipo draga de Petersen

(0,0682 m²) e Eckman (0,0225 m² de área) para os trechos do Rio Doce e lagos e um coletor tipo Surber (0,09 m²) no córrego São Pedro Frio (P09) e no ribeirão Palmas (P07) (Figura 6). As amostras coletadas foram colocadas em sacos plásticos e foram fixadas em campo com solução de formalina a 4% e conduzidas ao Laboratório de Biologia Molecular Beagle/UFV. No laboratório, as amostras foram lavadas sobre peneiras de 0,250 a 0,500mm de malha, e triadas com auxílio de microscópio estereoscópico (Figura 7). Os macroinvertebrados bentônicos foram identificados ao menor nível taxonômico quando possível utilizando-se de manuais de identificação (MERRITT; CUMMINS, 1996; COSTA et al., 2006; MUGNAI et al., 2010; HAMADA et al., 2014). Com os dados da composição das comunidades foram calculados a riqueza, densidade, composição em grupos tróficos funcionais (GTF) e abundância relativa dos grupos mais representativos. Os exemplares foram identificados e etiquetados segundo as recomendações de França e Callisto (2007) e serão depositados em Coleção de Macroinvertebrados Bentônicos do Laboratório de Sistemática Molecular Beagle/UFV.

Figura 6. Tipos de amostradores utilizados para a coleta de macroinvertebrados bentônicos nos trechos lóticos e lênticos do baixo Rio Doce.



Figura 7: Processo de triagem (a) e identificação dos macroinvertebrados bentônicos (b).



Junto com a coleta de macroinvertebrados, foi realizada uma classificação da integridade ambiental por meio de uma caracterização rápida de condições ecológicas de habitats dos ambientes lóticos. Para isso, foi aplicado o protocolo de caracterização habitats físicos de bacias hidrográficas proposto por Callisto et al. (2002). Este protocolo avalia um conjunto de parâmetros (22 parâmetros) em categorias descritas tais como: tipo de fundo, cobertura vegetal no leito dos rios e outros, em que são atribuídos valores (pontos) para diferentes condições destes parâmetros. O valor final do protocolo (que varia de 0 à 100 pontos) é obtido a partir do somatório dos valores atribuídos a cada parâmetro independentes e as pontuações finais refletem o nível de preservação das condições ecológicas dos pontos amostrados, onde de 0 a 40 pontos representam trechos impactados; 41 a 60 pontos representam trechos alterados; acima de 61 pontos, trechos minimamente alterados à natural (Quadro 1).

Além da caracterização dos habitats, variáveis físico-químicas de qualidade de água (pH, temperatura °C, condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}$, oxigênio dissolvido e turbidez NTU) foram mensuradas na coluna d'água dos pontos amostrais de macroinvertebrados com auxílio de sonda multiparâmetro (Hanna - HI9829). Os valores obtidos foram comparados aos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para água de classe 2 que são águas que podem ser destinadas para: a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; b) à proteção das comunidades aquáticas; c) recreação de contato primário; d) irrigação de hortaliças e outros com os quais o público possa ter contato direto; e e) à aquicultura e à atividade de pesca. Na ausência de valores de referência para os parâmetros de condutividade elétrica e temperatura na Resolução CONAMA 357/2005, foram considerados os valores de referência da CETESB/2016.

Para avaliar a qualidade das águas dos pontos de amostragem foi utilizado o índice multimétrico bentônico de Ferreira et al. (2011). Este índice avalia a qualidade dos ambientes de acordo com as pontuações atribuídas à métricas bióticas com base nas proporções de organismos sensíveis e tolerantes aos impactos. O índice é composto de seis métricas bióticas: Riqueza de famílias, % Oligochaeta, % Chironomidae + Oligochaeta (%CHOL), % Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera (%EPT), % coletores-catadores e BMWP-CETEC - *Biological Monitoring Working Party*. Foram atribuídos escores (5, 3 e 1) a cada métrica para o estabelecimento dos limites das classes de qualidade de água (Tabela 3). Os limites foram calculados pela agregação dos escores de cada métrica e determinados pelos valores mínimos e máximos no intervalo de 6 a 30. O valor da agregação das métricas foi dividido para o estabelecimento das classes de qualidade de água: 6-12 condição de qualidade de água ruim; 13-18 qualidade regular; 19-24 qualidade boa e 25-30 qualidade muito boa.

Tabela 3: Intervalo dos escores das métricas do Índice Biótico Bentônico.

Métricas	Scores		
	5	3	1
Riqueza	≥ 9	8-6	$5 \leq$

Métricas	Scores		
	5	3	1
% Oligochaeta	≤ 5	6-46	$\geq 47 \leq 97$
% CHOL	≤ 73	74-86	$\geq 87 \leq 100$
% EPT	≥ 6	5-3	≤ 2
%Coletores – catadores	≤ 64	65-83	$\geq 84 \leq 99$
BMWP-CETEC	≥ 36	35-18	≤ 17

2.2 COLETA DE ICTIOPLÂNCTON

O ictioplâncton foi amostrado quinzenalmente entre os meses de dezembro de 2020 e fevereiro de 2021, que corresponde ao período chuvoso, e mensalmente entre abril e agosto de 2021, durante o período de estiagem. Dois turnos de amostragem foram empregados para minimizar os efeitos da variação nictemeral do ictioplâncton, um ao anoitecer (19h-20h) e o outro ao amanhecer (6h-07h). Durante as amostragens foi utilizada uma rede de plâncton cônico-cilíndrica (malha de 0,5 mm, área da boca de 0,12 m²), equipada com fluxômetro General Oceanics™, o qual foi fixado na boca da rede, para medir o volume de água filtrada, permitindo a padronização do esforço de amostragem. Nas estações de amostragem localizadas na calha do rio Doce (P1 a P4), foram realizadas três sequências de amostragens superficiais ao longo do perfil transversal, sendo uma no centro (ponto de maior profundidade aparente do leito do rio) e outras duas nas margens esquerda e direita, enquanto nas demais estações (P5 a P11), por possuírem uma área de drenagem menor, a coleta foi realizada apenas na região central (Figura 8). Em cada amostragem foram realizadas coletas com duração de 10 minutos. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em potes plásticos e fixadas em solução de formaldeído 4%, tamponada com carbonato de cálcio (Figura 8). Para cada amostra foi coletada uma réplica, a qual foi fixada em álcool absoluto, sendo destinada para identificação molecular na Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As variáveis ambientais foram medidas simultaneamente às coletas de ictioplâncton usando um turbidímetro portátil e sonda multiparâmetros, obtendo-se as variáveis, temperatura (°C), oxigênio dissolvido (mg/L), pH, turbidez (NTU) e condutividade elétrica (µS/cm).

No laboratório, os ovos e larvas de peixes foram separados do sedimento e quantificados em microscópio estereoscópico com aumento de 10x (Figura 9). Para a identificação das larvas, foi empregada a técnica de sequência regressiva de desenvolvimento, a qual utiliza a forma do corpo, presença de barbilhões, sequência de formação das nadadeiras, posição relativa da abertura anal em relação ao corpo, número de vértebras/miômeros e raios das nadadeiras (AHLSTROM; MOSER, 1976; Nakatani et al., 2001). Em seguida, as larvas foram enquadradas em estágios de desenvolvimento de acordo com Ahlstrom e Moser (1976) modificado por Nakatani et al. (2001).

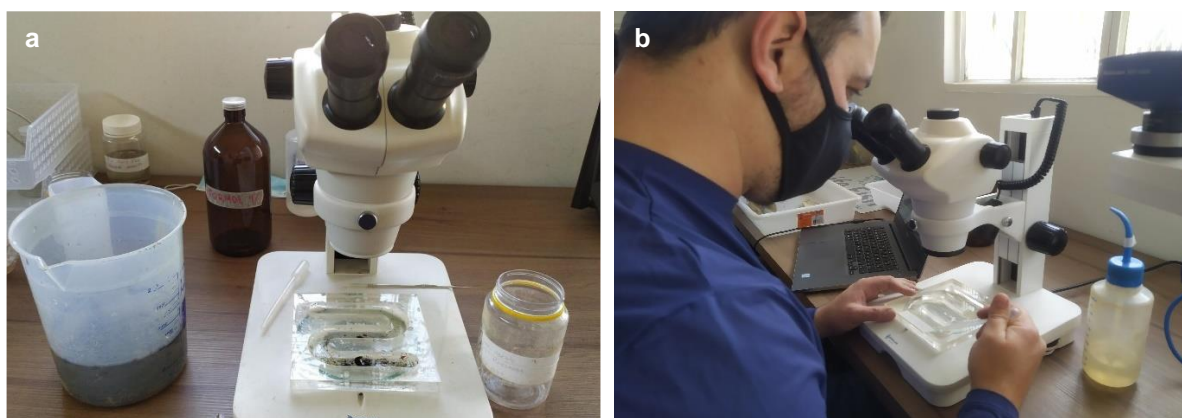
Os exemplares de peixes coletados foram destinados à coleção de peixes do Museu de Ciência Naturais da PUC Minas. As larvas e juvenis foram destinadas para a Coleção Ictiológica do Nupélia na

Universidade Estadual de Maringá. Os processos de tombamento nas coleções supracitadas foram afetados pela pandemia da COVID 19, mas já estão em procedimento.

Figura 8: Procedimentos de amostragem do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo. a) fluxômetro; b) amostragem sobre barco; c) amostragem sobre ponte; d) amostra fixada e acondicionada em pote plástico.



Figura 9: Triagem das amostras obtidas no monitoramento do ictioplâncton dulcícola durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo. a) disposição em bancada e b) separação dos ovos e larvas de peixes sob estereomicroscópio.



2.2.1 Amostragem em lagoas marginais e remanso

Cada lagoa foi amostrada em duas campanhas, sendo a primeira em janeiro (dias 24, 26 e 27) e a segunda em fevereiro (dias 19 e 21) de 2021. As coletas ocorreram no período diurno entre 09:00 e 12:00 horas, com o auxílio de três petrechos (tarrafa, rede de arrasto e peneirão), buscando abranger os diferentes *habitats* e ciclos de vida dos peixes. Em ambientes rasos de praia, foram utilizados de um a três conjuntos de tarrafa com malha de 3 cm entre nós opostos e uma rede de arrasto (malha fina para captura de ictioplâncton e juvenis). Nas áreas marginais com maior concentração de vegetação aquática, foi adotado um peneirão com malha de 0,5 mm e área retangular da boca de 0,96 m², conforme sugerido por Cabacinha et al. (2019) (Figura 10).

Em cada coleta, foram realizados 10 lances de tarrafa distribuídos em áreas rasas, bem como cinco arrastos horizontais com a rede de malha fina e 10 lances de amostragem com o peneirão nas margens das lagoas. Os exemplares amostrados foram eutanasiados com o uso de solução de eugenol e, posteriormente, fixados em solução de formalina 10% tamponada e conservados em álcool 70% (Figura 10).

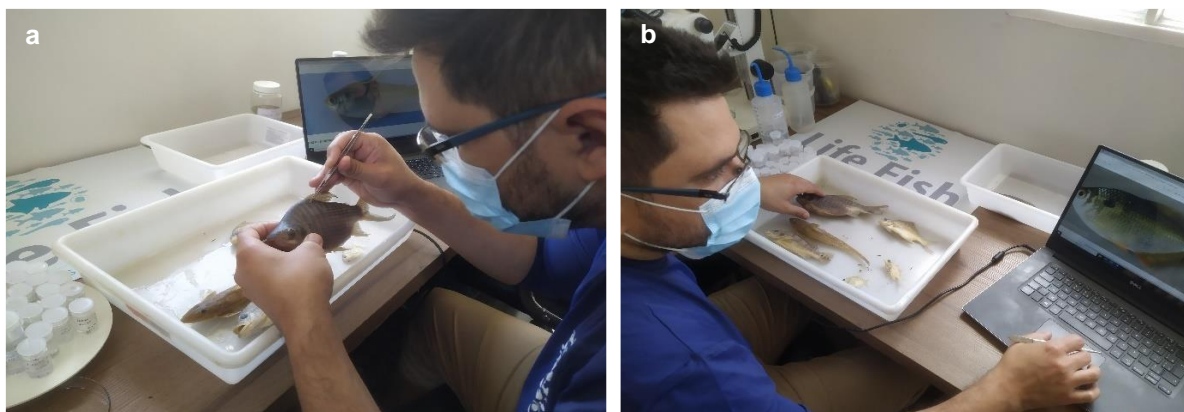
Figura 10: Procedimentos de amostragem de juvenis em lagoas marginais e remanso durante o Ano 3, no baixo rio Doce, Espírito Santo. a) tarrafa; b) rede de arrasto; c) peneirão; d) exemplares da ictiofauna capturados.



Os indivíduos jovens capturados nas lagoas marginais foram submetidos a uma avaliação macroscópica para visualização de características morfológicas que permitiram a sua identificação

taxonômica, de acordo com as listas disponíveis no Livro vermelho da biota aquática do Rio Doce (SARMENTO-SOARES et al. 2017; FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, 2021) (Figura 11).

Figura 11: Processo de identificação dos juvenis coletados nas lagoas marginais e remanso durante o Ano 3, baixo rio Doce, Espírito Santo. a) identificação de características morfológicas e b) verificação de listas taxonômicas.



2.3 COLETA DE ICTIOFAUNA

A coleta da ictiofauna foi realizada utilizando-se o esforço amostral de nove redes de espera, representando uma área de cobertura total de 90 m² com diferentes malhas de igual área (10 m²): malha 3 representando 15mm entre nós opostos; malha 4, 20 mm; malha 5, 25mm; 6, 30mm; 7, 35mm; 8, 40mm; 10, 50mm; 12, 60mm e malha 14 representando 70mm entre nós opostos (Figura 12 a). As redes foram colocadas às 16hs e retiradas às 20h, totalizando quatro horas de exposição. Adicionalmente, 10 passadas com rede de arrasto (malha 5mm entre nós opostos, altura de 2,5 m e comprimento de 10 m, representando uma área de cobertura total de 250 m²) e 46 lances de tarrafa (malhas 20mm e 40mm, altura de 2m, representando uma área de cobertura total de 1300 m²) também foram realizados em cada ponto (Figura 12 b, c). Em todos os pontos foram aplicadas as mesmas metodologias e com o mesmo esforço amostral, sempre tentando maximizar as amostragens em todos os ambientes de cada ponto de coleta. Apenas no ponto 09, no córrego São Pedro Frio, as coletas foram realizadas com pesca elétrica (Smith-Root backpack electrofisher - LR-24 Electrofisher) num trecho de 150 m e com um esforço de 1 hora ((Figura 12 d). Conforme definido em reunião realizada em julho de 2018, com representantes do PMBA/Fest-RRDM, da Renova e do CT-BIO, a exposição das redes foi de aproximadamente 4 horas (16 às 20 horas), para garantir a qualidade e quantidade de peixes amostrados para análises genéticas e de conteúdo estomacal. Nos lagos, a predação por piranhas aumenta com o tempo de exposição das redes. Cabe ressaltar que o menor tempo de exposição das redes garantiu a qualidade dos resultados genéticos, de dieta e de determinação do estágio de maturação gonadal, evitando também a mortandade de espécimes. Não foi possível fazer a revisão das redes após as 4h de exposição e a retirada das mesmas após as 12h devido à dificuldade de acesso em alguns pontos.

Após a coleta, ainda no campo, todos os peixes foram anestesiados com eugenol e fixados em solução de formalina 10% ou álcool etílico 100%, até 10 exemplares de cada espécie e maiores que 10 cm tiveram amostras de tecido retiradas ainda em campo. No laboratório os espécimes foram triados, identificados e submetidos a análises biométricas (Figura 13). O estômago e as gônadas dos espécimes foram retirados e armazenados em álcool etílico 70% para análises estomacais e de desenvolvimento gonadal. Todos os espécimes tiveram tecido muscular amostrado para estudos de cunho molecular e foram transferidos, em solução de álcool etílico 70%, para depósito na coleção ictiológica do Museu de Zoologia João Moojen, na Universidade Federal de Viçosa - UFV (*Material Suplementar A7DES1*).

A caracterização da ictiofauna, apresentada neste relatório, compreende toda a ictiofauna amostrada durante todo o monitoramento, assim como análises com tendências de ocorrência ou declínio consideradas como relevantes e uma relação provisória de espécies consideradas “tolerantes” e “intolerantes” às condições preponderantes na Área Ambiental I.

Junto com a coleta de ictiofauna foram obtidos parâmetros abióticos como temperatura, pH (pH e mVORP), turbidez, salinidade, oxigênio dissolvido (OD% e ppmDO) e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$ e $\mu\text{S}/\text{cm}^2$), utilizando uma sonda multiparâmetro (Hanna - HI9829).

Figura 12: Petrechos de coleta utilizados nas amostragens de ictiofauna. (a) rede de espera; (b) rede de arrasto; (c) tarrafa; (d) pesca elétrica.



Figura 13: Triagem (a), biometria (b), análise de conteúdo estomacal (c) e extração de tecido durante atividade de campo para análise molecular (d). A foto (d) foi tirada antes da pandemia de COVID19.



3 ANÁLISE DE DADOS

3.1 MACROINVERTEBRADOS BENTÔNICOS

3.1.1 Composição de estrutura da comunidade de macroinvertebrados

No intuito de se analisar as diferenças nas composições das assembleias de macroinvertebrados amostradas nos diferentes ecossistemas aquáticos entre os períodos chuvoso e seco, foram calculados os índices de diversidade de Shannon-Wiener (H'), Equitabilidade de Pielou (J') e Dominância de Simpson (D_s). O índice de Shannon usado para quantificar a diversidade considera em sua base de cálculo a riqueza e a dominância das espécies dando igual peso às espécies raras e as mais abundantes:

$$H' = \frac{[N \ln(N) - \sum_{i=1}^S n_i \ln(n_i)]}{N}$$

Em que: H' = Índice de Shannon-Wiener; n_i = número de indivíduos da i -ésima espécie; N = número total de indivíduos amostrados; S = número total de espécies amostradas (riqueza); \ln = logaritmo de base neperiana.

A equitabilidade (ou equidade) de Pielou (J') se refere a distribuição das espécies e a proporção das espécies em uma amostra:

$$J' = \frac{H'}{H_{max}}$$

Em que: J' = Equitabilidade de Pielou; H' = Índice de diversidade de Shannon-Wiener; $H_{max} = \ln(S)$; S = número total de espécies amostradas (riqueza).

A dominância de Simpson (D_s) se refere a probabilidade de dois indivíduos, selecionados ao acaso na amostra, pertencerem à mesma espécie e quanto maior o valor de (D_s), menor a diversidade da comunidade:

$$D_s = 1 - \frac{\sum_{i=1}^S n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Em que: D_s = Índice de dominância de Simpson; n_i = número de indivíduos amostrados da i -ésima espécie; S = número total de espécies coletadas; N = número total de indivíduos amostrados.

Análises de espécies indicadoras foi realizada com o intuito de verificar quais *taxa* são mais importantes na diferenciação das composições das assembleias de macroinvertebrados das estações de amostragens no período chuvoso de 2019/2020 e período seco de 2021. Esta análise confere a cada *taxon* valores de indicação (IndVal), que variam de 0 a 100, segundo a abundância e a frequência relativa de cada um nos grupos definidos previamente, que nesse caso serão estações amostrais e condições ecológicas para os trechos de rios. Se, para um dado *taxon*, os valores de indicação entre os grupos forem significativamente diferentes ($p < 0,05$ em um teste de Monte Carlo com 10.000

iterações), então este *taxon* pode ser considerado como indicador de um dos grupos. As análises foram realizadas utilizando software livre R.

A classificação dos macroinvertebrados em grupos de alimentação funcional foi aplicada para avaliar a distribuição das guildas tróficas ao longo do monitoramento PMBA/Fest-RRDM nos períodos chuvoso 2019/2020 e seco 2021 e subsidiar informações para o cálculo do Índice Multimétrico Bentônico (FERREIRA et al. 2011) e avaliação de deformidades no mento de larvas da família Chironomidae coletoras-catadora.

Curva de acumulação de espécie ou curva do coletor foi aplicada utilizando sete estimadores de riqueza de espécies (Chao 1 e 2, Jackknife 1 e 2, Bootstrap, ACE e ICE) com o intuito de avaliar como a riqueza de macroinvertebrados bentônicos varia de acordo com o esforço amostral. O número de *taxa* aumenta com o aumento no número de amostras e quando a curva atinge a estabilização, ou seja, quando não se observa aumento da riqueza com o aumento do esforço amostral indicando que todas as espécies foram amostradas. Os estimadores permitem estimar o número esperado de espécie em relação ao observado em um conjunto de amostras. Além disso permite estimar um número mínimo necessário de amostras para a caracterização de uma comunidade em um determinado ecossistema. O estimador Bootstrap é o método de estimativa da riqueza que utiliza dados de todas as espécies coletadas para estimar a riqueza total. O estimador Chao 1 determina o número absoluto em uma comunidade e é baseado no número de espécies raras dentro de uma amostra e requer a abundância das espécies; o estimador Chao 2 consiste numa modificação do Chao 1 para uso com dados de presença/ausência levando em conta a distribuição das espécies entre as amostras; o estimador Jackknife se baseia na ocorrência de espécies e o número de amostras para estimar a riqueza total. O estimador ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*) tem com foco na abundância das espécies raras no qual permite determinar os limites para os quais uma espécie seja considerada rara. Como consenso em geral são consideradas espécies raras aquelas com abundância entre 1 e 10 indivíduos. A riqueza pode variar conforme aumente ou diminua o limiar de abundância. O estimador ICE (*Incidence-based Coverage Estimator*) diferente do ACE tem foco nas espécies infrequentes e assim permite determinar os limites para os quais uma espécie seja considerada infrequente. Como consenso também são consideradas espécies infrequentes aquelas com incidência entre 1 e 10 indivíduos, embora exista pesquisadores que considerem espécies infrequentes entre 1 a 20 indivíduos (SANTOS, 2003; CHAO; CHIU, 2016; PROVETE et al., 2011).

Com o objetivo de avaliar mudanças na comunidade ao longo do monitoramento nos períodos chuvoso 2019/2020 e seco 2021, o índice beta diversidade temporal da macrofauna bentônica, amostradas em diferentes ambientes (calha do Rio Doce e lagos na porção baixa da bacia), foi avaliado seguindo a proposta de Legendre et al. (2019). Diferentemente da partição da diversidade beta taxonômica proposta por Baselga (2010), a abordagem da beta diversidade temporal é calculada progressivamente entre uma campanha e outra, podendo ser particionada entre a fração da beta diversidade devida ao ganho (fração B: Appearance) e a perda de espécies (fração C: Disappearance) (LEGENDRE, 2019).

A beta diversidade temporal foi calculada utilizando a função “turnover” do pacote codyn (HALLETT et al., 2016).

Uma análise de variância ANOVA-OneWay foi aplicada para avaliar as diferenças sazonais de chuva e seca na composição das comunidades de macroinvertebrados bentônicos ao longo de sete trechos lóticos e três lagos no Baixo Rio Doce durante o PMBA/Fest-RRDM. Quando necessários os dados da composição da macrofauna bentônica foram $\log(x+1)$ transformados para ponderar as discrepâncias e promover a padronização. Em seguida foi aplicada a análise dos resíduos dos dados com o objetivo verificar se a homogeneidade da variância e homocedasticidade dos dados atenderam os pressupostos da ANOVA. As análises foram realizadas em software livre na plataforma R-Studio (R CORE TEAM, 2015).

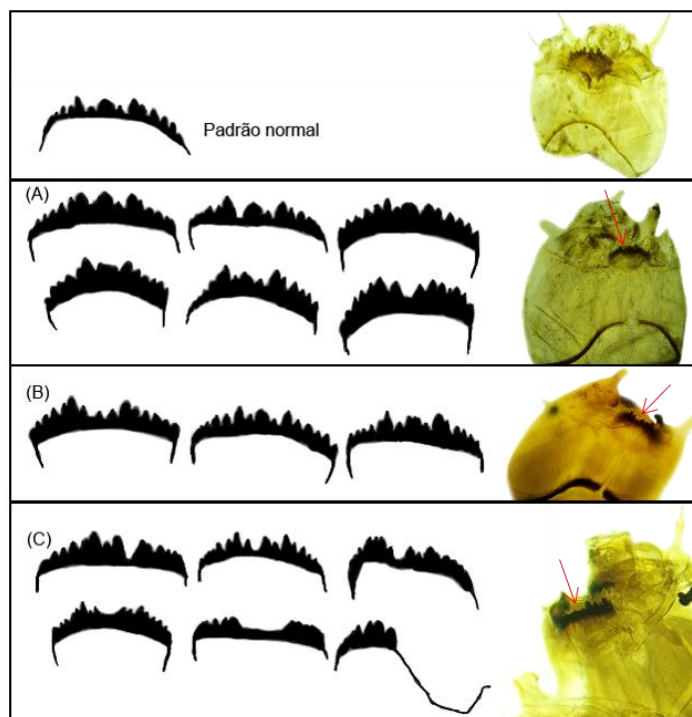
Uma análise de correspondência canônica (CCA) foi aplicada com o objetivo de avaliar a influência de fatores ambientais sobre as assembleias de macroinvertebrados bentônicos nos períodos sazonais chuvoso de 2019/2020 e seco de 2021. Para os trechos lóticos foram utilizadas como variáveis preditoras os fatores ambientais obtidos pelo protocolo de habitat (CALLISTO et al., 2002) e fatores físico-químicos de qualidade de água (pH, temperatura °C, condutividade elétrica $\mu\text{S}/\text{cm}$, oxigênio dissolvido e turbidez NTU) e para as lagoas foram utilizados os fatores físico-químicos. As análises foram realizadas em software livre na plataforma do R-Studio (R CORE TEAM, 2015).

3.1.2 Avaliação de deformidades no aparelho bucal (mento) de larvas de Chironomidae

As larvas da família de Chironomidae coletadas foram identificadas ao nível de gênero e em seguida foram determinados os grupos de alimentação funcional (GTFs) segundo a literatura disponível. As larvas classificadas como coletoras-catadoras, que se alimentam principalmente de matéria orgânica, tiveram suas partes bucais dispostas em lâminulas para serem analisados em microscópio e avaliar os padrões destas partes e identificar deformidades no aparelho bucal (mento).

A metodologia foi basicamente a proposta por Callisto et al. (2000) em um estudo na bacia do rio Piracicaba afluente do Rio Doce. Neste estudo Callisto e colaboradores (2000) avaliaram 3 classes de deformidades divididos em 15 diferentes variações comparadas ao padrão normal (A - sem dente lateral externo; B – deformidade medial fraca e C – deformidade medial severa ou qualquer combinação de fortes deformidades, Figura 14).

Figura 14: Classificação de deformidades do mentum de larvas de insetos do gênero *Chironomus*. A - Sem dente lateral externo; B – Deformidade medial fraca e C – Deformidade medial severa ou qualquer combinação de fortes deformidades. Figura adaptada de Callisto et al. (2000).



3.2 ICTIOPLÂNCTON

A abundância dos organismos capturados nas redes de plâncton foi padronizada para um volume de 10m³ de água filtrada de acordo com Tanaka (1973), modificado por Nakatani *et al.* (2001), utilizando-se a expressão: $Y=(X/V).10$, onde: Y = Densidade de organismos/10m³; X = Número de organismos capturados; V = Volume de água filtrada (m³). Para o cálculo do volume de água filtrada foi utilizada a expressão: $V = a.n.c$; onde: V = Volume de água filtrada (m³); a = Área da boca da rede (m²); n = Número de rotações do fluxômetro; c = Fator de calibração do fluxômetro.

Com o objetivo de verificar a distribuição espacial do ictioplâncton, a densidade de ovos e larvas resultante de cada réplica coletadas ao amanhecer e anoitecer foram agrupadas por estação de amostragem. Para a análise da distribuição temporal, as densidades resultantes de todos os turnos e estações amostrais foram agrupadas em períodos mensais de amostragem. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para avaliar a variação espacial e temporal (variáveis independentes: locais e períodos de amostragem) da densidade de ovos e larvas (variáveis dependentes).

Quando significativos os resultados de Kruskal-Wallis, um teste de Mann-Whitney foi realizado *a posteriori* para detectar as diferenças entre as estações e meses de amostragem. Para cada estação de amostragem, as densidades de larvas identificadas (táxon/10 m³) foram obtidas pela soma de cada um dos táxons coletados considerando todas as réplicas, períodos e turnos. A partir dessas

densidades, foi determinada a quantidade de larvas/táxons e diferentes estágios de desenvolvimento para cada trecho, identificando a proximidade com suas áreas de desova.

3.3 ICTIOFAUNA DULCÍCOLA: ECOLOGIA

3.3.1 Estrutura e dinâmica das populações de ictiofauna

A análise dos resultados obtidos pelo PMBA/Fest-RRDM incluiu aspectos históricos da porção capixaba do Rio Doce, considerando as informações de ocorrência das espécies, em estudos anteriores e posteriores ao rompimento da barragem de Fundão em 2015, afim de resgatar e construir uma provável listagem da comunidade ictiofaunística dessa região. Para isso, foram utilizados cinco bancos de dados, sendo todos filtrados somente para porção capixaba do Rio Doce: 1) Dados publicados sobre o inventário do reservatório da UHE Mascarenhas (CTA, 2009); 2) Listagem das espécies do Baixo Rio Doce (VIEIRA, 2010); 3) Relatório Econservation- Renova, realizado entre 2017 e 2018, em quatro campanhas de coleta, utilizando cinco pontos amostrais; 4) Dados obtidos pelo Convênio UFV-Renova (2019), com duas coletas realizadas entre 2018/2019, em que consideramos seis pontos e 5) SpeciesLink (CRIA, 2021: <https://specieslink.net/>).

A classificação taxonômica, a distribuição geográfica e informações de habitat seguiram Fricke et al. (2021). Além das espécies de água doce obrigatórias (*sensu* MYERS, 1938) foram incluídos dados de espécies estuarinas e marinhas, e espécies que ocorrem em lagoas e lagos.

3.3.2 Composição e estrutura da comunidade de ictiofauna.

Curva do coletor, rarefação e estimadores de riqueza

Curvas do coletor, que demonstram o número acumulado de espécies ao longo das amostragens, foram geradas para cada ambiente monitorado (calha do Rio Doce, lagos e córregos) utilizando a função “specaccum” (método random). Já, as curvas de rarefação, que calcula o número esperado de espécies em função do número de indivíduos, foram geradas com a função “rarecurve”. Ambas funções estão disponíveis no pacote *Vegan* do R (OKSANEN et al., 2020). Para contemplar as diretrizes do TR4, também foram realizadas estimativas de riqueza total, modeladas por meio de curva do coletor considerando os seguintes estimadores: Jackknife 1 e 2, Chao 1 e 2, e Bootstrap utilizando a função “diversity” do pacote *BiodiversityR* do R (KINDT; COE, 2005).

Índices descritores da comunidade de ictiofauna

Para a descrição da comunidade foram apresentados os seguintes índices: Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, com intervalos de confiança obtidos por meio da aplicação de procedimento

bootstrap; Índice de Simpson - dominância e equitabilidade. Todos os índices foram obtidos com os pacotes *vegan* (OKSANEN et al., 2020) e *BiodiversityR* do R (KINDT; COE, 2005).

Dissimilaridades na comunidade de ictiofauna

Para a avaliação da dissimilaridade das comunidades em cada período sazonal, foi realizada uma análise de partição da diversidade beta utilizando a função “beta.multi” do pacote *betapart* (BASELGA et al 2018). Nesta análise, a dissimilaridade de Jaccard é considerada a diversidade beta total e ela é particionada entre seu componente de Turnover (que representa a substituição de espécies) e Nestedness-resultant (aninhamento resultante da dissimilaridade; BASELGA, 2012). A partição da diversidade beta foi construída com uma matriz de presença e ausência da ictiofauna amostrada ao longo do monitoramento considerando cada ambiente separadamente: calha do Rio Doce, lagos, córrego situado à montante (ponto 09) e córrego situado à jusante (ponto 07).

Avaliação temporal da Ictiofauna – Riqueza, abundância, biomassa e diversidade beta temporal

Para os ambientes calha e lagos do Baixo Rio Doce, os indicadores riqueza (total, de nativas e introduzidas), abundância (total, de nativas e introduzidas) e biomassa (total, de nativas e introduzidas) foram analisados ao longo do monitoramento. Boxplots foram gerados considerando os pontos amostrados em cada campanha. Como a ictiofauna foi amostrada com três petrechos de pesca diferentes e esses petrechos tendem a capturar número de indivíduos e biomassa muito distintos, essas avaliações são apresentadas para cada petrecho. Adicionalmente, anovas e teste de Tukey foram realizados para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos indicadores em cada período sazonal. Para essa análise foi utilizado o pacote Stats do R (R Core Team, 2021).

Com o objetivo de avaliar mudanças na comunidade ao longo do monitoramento, o índice de beta diversidade temporal da ictiofauna, amostrada com diferentes petrechos e em diferentes ambientes (calha e lagos), foi avaliado seguindo a proposta de Legendre et al. (2019). Diferentemente da partição da diversidade beta taxonômica proposta por Baselga (2010), a abordagem da beta diversidade temporal é calculada progressivamente entre uma campanha e outra, podendo ser particionada entre a fração da beta diversidade devida ao ganho (fração B: *Appearance*) e a perda de espécies (fração C: *Disappearance*) (LEGENDRE, 2019). A beta diversidade temporal foi calculada utilizando a função “turnover” do pacote *codyn* (HALLETT et al., 2020).

Avaliação espacial da ictiofauna

Para avaliar espacialmente a ictiofauna, os indicadores de riqueza e biomassa de espécie nativas e introduzidas foram transformadas em proporção e especializado por meio de Sistemas de Informação Geográfica usando o ArcGis (ESRI, 2016). A espacialização foi realizada utilizando apenas os

petrechos de rede de arrasto e rede de espera por serem os petrechos que capturam a maior parte da diversidade.

Relações entre riqueza (número de espécies) e composição da ictiofauna com as variáveis ambientais

Regressões lineares múltiplas foram realizadas para verificar a relação dos indicadores riqueza total, riqueza de nativas e riqueza de introduzidas com as variáveis ambientais: temperatura da água, pH (pH e mVORP), turbidez, salinidade, oxigênio dissolvido (OD% e ppmDO) e condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$ e $\mu\text{S}/\text{cm}^2$). Um modelo de regressão linear múltipla foi gerado com todas as variáveis e posteriormente foi utilizada a função “step” do pacote *stats* do R para selecionar o modelo com a melhor combinação de variáveis que apresentam menor valor de AIC e melhor explicam a variação da variável resposta. A avaliação foi realizada em cada ponto de amostragem separadamente, utilizando a campanha como unidade amostral. Previamente às análises, uma correlação de Pearson foi utilizada para avaliar a colinearidade ($r > 0.6$) entre as variáveis ambientais, sendo as variáveis oxigênio dissolvido (ppmDO), salinidade, condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$) e pH (mVORP) excluídas das análises. Como as variáveis possuem magnitudes de valores diferentes, seus valores foram transformados por z-score para tornar seus coeficientes comparáveis.

Análises de redundância (RDA) foram realizadas para verificar a relação entre a composição de espécies e as variáveis ambientais obtidas em cada amostragem com a sonda multimétrica (temperatura da água, condutividade, turbidez, pH e oxigênio dissolvido). Optou-se por utilizar a análise de redundância para poder particionar o efeito ambiental, espacial e temporal sobre a comunidade de peixes. Peixes são organismos que possuem boa capacidade de dispersão e para controlar o efeito espacial autovetores espaciais foram criados e incorporados como variáveis ambientais nas análises. Os autovetores espaciais dbMEM (distâncias baseadas em autovetores de Moran), apresentam grandes vantagens analíticas e produzem descritores espaciais que cobrem uma gama ampla de escalas espaciais (BORCARD et al., 2018). Para controlar o efeito da periodicidade das coletas, autovetores temporais também foram criados utilizando as datas de realização de cada campanha. Os dbMEM temporais e espaciais foram construídos com a função “dbmem” do pacote *adespatial* e posteriormente selecionados com a função “forward.sel” considerando sua relação com a composição da ictiofauna. Após a seleção dos autovetores espaciais e temporais, uma partição de variância foi realizada utilizando a função “varpart” considerando as matrizes ambiental (variáveis obtidas com a sonda multimétrica e que não são colineares), temporal (dbMEM temporais) e espacial (dbMEM espacial) sobre a composição da ictiofauna. A matriz de composição de espécies foi transformada para presença/ausência para considerar a comunidade amostrada com todos os petrechos de pesca utilizados. Previamente às análises, as variáveis preditoras foram transformadas por z-score. Para minimizar o ruído das análises, apenas espécies que foram amostradas em mais de cinco ocasiões foram consideradas. As análises foram realizadas separadamente para os ambientes calha e lagos. Posteriormente a partição de variância, para os ambientes em que o efeito ambiental foi importante,

uma RDA foi realizada controlando o efeito espacial e temporal para verificar a relação das espécies com as variáveis ambientais.

3.3.3 Ecologia Trófica

Todas as espécies coletadas, exceto o espécime diminuto de *Microcambeva jucuensis*, tiveram seus conteúdos estomacais analisados, visando ter uma abordagem mais ampla possível sobre a estrutura trófica nos locais amostrados.

O conteúdo estomacal foi avaliado com um microscópio estereoscópico e óptico; e os itens alimentares encontrados foram analisados até o menor nível taxonômico possível com auxílio de chaves de identificação (MERRITT; CUMMINS, 1996; COSTA et al., 2006; MUGNAI et al., 2010). A quantificação dos itens alimentares foi feita pelo método volumétrico (HELLAWELL; ABEL, 1971; HYSLOP, 1980), utilizando uma proveta graduada onde o volume era medido por meio do deslocamento da coluna d'água para os itens maiores ou com auxílio de uma placa de vidro milimetrada, para os itens alimentares menores. Os recursos alimentares foram quantificados através do volume em porcentagem de cada item em relação ao total.

Os itens alimentares encontrados foram agrupados em 17 categorias alimentares:

- 1) Sedimentos: pedras e areia;
- 2) Detrito: matéria orgânica altamente particulada;
- 3) Matéria orgânica: matéria orgânica não particulada de origem animal e vegetal;
- 4) Algas: algas filamentosas e diatomáceas;
- 5) Vegetal: origem terrestre e aquática;
- 6) Tecameba: somente Tecameba;
- 7) Rotífera: somente Rotífera;
- 8) Mollusca: Gastropoda e Bivalve;
- 9) Microcrustáceos: Cladocera, Copepoda, Ostracoda e Conchostraca
- 10) Arachnida: aranha e ácaro
- 11) Camarão: somente camarão
- 12) Insetos terrestres: taxa como Coleoptera, adulto de Diptera, Homoptera, Hymenoptera, Isoptera, Thysanoptera, Orthoptera e fragmentos não identificados;
- 13) Insetos aquáticos: taxa como Collembola, Lepidoptera, Megaloptera, Coleoptera, Trichoptera, Ephemeroptera, Odonata, Hemiptera, Pupa de Diptera, Chironomidae, Ceratopogonidae, Tipulidae, Tabanidae, Psocodidae, Empididae, Stratiomidae e fragmentos não identificados;
- 14) Outros invertebrados: Nematoda, Taenia e Oligochaeta;
- 15) Peixe: peixe, escama e otólito, ou outras partes;
- 16) Réptil: lagarto, serpente
- 17) Larva de Amphibia: somente larva de Anfíbio (girino).

O Índice de Importância Alimentar (IAI - conforme consta no TR4) não foi utilizado como método de análise estomacal. A literatura aponta que o método volumétrico vem sendo bem empregado e que a conclusão geral utilizando volume (%V) é muito similar ao resultado obtido com o IAI (HAHN; DELARIVA, 2003; SILVEIRA et al., 2020). Além disso, IAI é mais utilizado em situações onde não há o emprego de análises estatísticas, uma vez que essas análises requerem transformações para adequação dos dados.

As guildas tróficas das espécies analisadas foram determinadas a partir dos valores do volume em porcentagem obtidos para as 17 categorias alimentares citadas acima. As determinações das guildas tróficas foram realizadas de acordo com Dias et al (2020), para detritívoros, herbívoros, invertívoros, onívoros, insetívoro e piscívoros; Hahn et al (1998), para bentófagos, insetívoros aquáticos e insetívoros terrestre e Andrade et al. (2019), para carnívoros. Vale ressaltar que onívoros foram determinados pela proporção dos maiores itens consumidos. Para aquelas espécies com menos de 7 estômagos avaliados, as guildas tróficas foram definidas através de dados de dieta da literatura (FIGUEIREDO; MENEZES, 1980; SILVANO, 2001; FRIAS-TORRES, 2004; PEREIRA; RESENDE, 2006; SANTOS; ROCHA, 2007; FISCHER et al., 2011; VIEIRA et al 2014; VIEIRA et al. 2015; MEDEIROS et al., 2017). Para ser determinado em uma guilda trófica, foi utilizado o valor acima 70% de consumo de um determinado item. Por exemplo, se uma espécie consumiu mais de 70% de invertebrados, ela foi classificada como invertívoro. Os dados das guildas tróficas foram tratados pelo número de indivíduos e a biomassa foi calculada a partir do peso dos indivíduos.

3.3.4 Biologia Reprodutiva

Indivíduos das espécies mais abundantes foram selecionadas e tiveram suas gônadas retiradas, pesadas (g) e identificadas quanto ao sexo e o estágio de desenvolvimento gonadal (VAZZOLLER, 1996). A relação peso-comprimento dos peixes foi determinada pela equação, onde W é o peso total (g), L o comprimento total (mm), a corresponde ao intercepto (coeficiente de crescimento inicial ou fator de condição) e b representa o coeficiente alométrico (coeficiente de crescimento ou táxons de crescimento relativa do peixe) (LE CREN, 1951; JOBLING, 2002). A proporção sexual entre macho e fêmea (M:F), foi calculada de acordo com o número total de machos dividido pelo número total de fêmeas (VAZZOLLER, 1996).

No Ano 1, 2 e 3, as avaliações dos estágios de desenvolvimento gonadal foram realizadas com base nas classificações macroscópica e microscópica, seguindo a metodologia proposta por Vazzoller (1996), conforme consta no TR4. Após avaliação macroscópica, fragmentos das gônadas foram desidratados em série crescente de etanol (70, 80, 90 e 100%) e embebidos em metacrilato (Historesin, Leica Microsystems, Nussloch, Germany). Seções semi-seriadas de 3 µm foram obtidas em micrótomo rotativo (Leica RM2255), para se obter o intervalo de no mínimo 40 µm entre os cortes e as lâminas obtidas foram coradas com azul de toluidina com borato de sódio 1%. As lâminas foram

fotografadas em fotomicroscópio óptico Olympus BX53, acoplado a câmera Olympus DP73 utilizando o software CellSens Imaging.

Também foram determinadas a relação gonadossomática (RGS), o Índice Gonadal (IG) e a variação temporal da RGS. A relação gonadossomática é uma relação entre o peso da gônada e o peso do indivíduo e pode ser expressa por: $RGS1 = Wo/Wt \times 100$. Onde Wo = peso das gonadas; Wt = peso total. Já o índice gonadal, ao fazer essa relação de peso da gônada e peso do indivíduo, utiliza o coeficiente linear da relação peso comprimento (VAZZOLLER, 1996). O "índice" gonadal, também denominado fator de condição gonadal, é expresso por: $IG = Wo/Ltb$, onde Wo = peso das gonadas; Lt = comprimento total. b = coeficiente angular da regressão Wt/Lt (VAZZOLLER et al., 1989). Os cálculos do fator de condição sob a influência do peso das gônadas (K) e sem o peso das gônadas (K') e fator de condição gonadal (ΔK) foram efetuados conforme Vazzoller (1981, 1996): $K = Wt / Lsb$; $K' = Wc/Lsb$; onde, $Wc = Wt - Wg$; Wt , peso total (g); Wc , peso total menos o peso da gônada; Ls , comprimento total (mm); Wg , peso da gônada; Wt , peso total do peixe; b , coeficiente de alometria obtido através da relação peso-comprimento; $\Delta K = K - K'$. O período reprodutivo foi estabelecido por meio da análise mensal do fator de condição, comparando os com a curva de maturação, com base na variação mensal do índice gonadossomático médio. O aumento dos valores do IG é relacionado com a variação do fator de condição para determinar o período reprodutivo, período esse em que ocorre maior investimento nas gônadas.

As variáveis dos pontos de coletas e por período de coleta (Ano 1, Ano 2 e Ano 3) foram testadas quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e submetidas a uma análise de variância para testar diferenças significativas nos valores médios de RGS e IG. O teste paramétrico de Duncan foi usado para comparar valores médios. Quando o pressuposto de normalidade não foi atendido, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Um nível de significância de $P < 0,05$ foi empregado para todos os testes.

3.3.5 Padrões de ocorrência e proposta de espécies tolerantes e intolerantes ao ambiente afetado pelo rejeito de minério

A ocorrência ou ausência de espécies nativas em locais impactados ou não impactados pelo rejeito de minério do rompimento da Barragem de Fundão foi utilizada para elaboração de um quadro de ocorrência de espécies tolerantes e intolerantes ao ambiente afetado pelo rejeito de minério. Inicialmente, foi construída uma matriz de ocorrência baseada nos resultados obtidos pela Econservation (2019), pelos três anos do PBMA/Fest-RRDM e pelo ACT Renova-UFV (Acordo de Cooperação Técnica Renova-UFV, em fase de finalização). A integração desses dados permitiu ampliar o conceito de ocorrência vs. ausência, com espécies que mesmo estando presentes, apresentam padrão consistente de estresse oxidativo na Área Ambiental I e não o apresentam em áreas não impactadas pelo rejeito de minério. Portanto, essas espécies ocorrem na Área Ambiental I, mas foram consideradas como intolerantes às condições que hoje caracterizam a calha impactada do Rio Doce.

Além desse critério, os 3 anos de coletas mensais do PB MBA/Fest-RRDM permitiram identificar um conjunto de espécies que foram coletadas no primeiro ano e que não foram coletadas no ano 3. Essas espécies também passaram a integrar o grupo de espécies intolerantes.

3.4 ICTIOFAUNA DULCÍCOLA: AVALIAÇÃO GENÉTICA

As amostras dos tecidos de peixes coletados no Ano 1, Ano 2 e Ano 3, além de amostras disponíveis na coleção zoológica da Universidade Federal de Viçosa, foram enviadas ao Laboratório de Evolução e Genética Animal - LEGAL da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), onde foram organizadas para as abordagens dos estudos genéticos.

3.4.1 DNA Barcode

Para os estudos moleculares com DNA *barcode* foram sequenciadas amostras de até cinco indivíduos de cada uma das espécies de peixe. Os DNAs genômicos das amostras e os genes de interesse foram amplificados, sequenciados, alinhados e editados como preparação para as análises genéticas subsequentes. Essa amostragem também foi utilizada para a realização de uma análise complementar, a estimativa do índice de diversidade filogenética. O intuito dessa análise é medir a variação temporal desse índice na comunidade de peixes do baixo Rio Doce e usá-lo como *proxy* para o monitoramento dos efeitos genéticos sofridos pela ictiofauna da região ao longo do tempo.

A região *barcode* do gene mitocondrial COI foi amplificada usando a combinação dos iniciadores COIFishF.2 (5'-TTRTGGRGCTACAAICCC-3') e COIFishR.1 (5'-TACTTCIGGGTGICCRAAGAAAYCA-3') (COLATRELI et al., 2012). Antes de realizar as análises de *barcode* foi checada a correta identificação taxonômica das amostras através da Basic Local Alignment Search Tool (Blast) e da reanálise de características morfológicas externas dos espécimes.

Para determinar as relações filogenéticas entre as espécies e populações de peixes coletados foi utilizada a metodologia do DNA *Barcode* (HEBERT et al., 2004) que usa o gene COI + árvore de *neighbor-joining* + modelo evolutivo Kimura - 2 - parâmetros. Entre os métodos que usam distâncias genéticas, o *neighbor-joining* é um dos mais usados, principalmente por causa da sua eficiência computacional, especialmente quando a quantidade de sequências analisadas é muito grande. Este método funciona em passos, minimizando a soma dos comprimentos dos ramos a cada passo do processo de agregação ("clusterização") das sequências (KUMAR et al., 2008).

Para as análises de delimitação baseadas nos princípios da coalescência, o banco de dados de sequências foi reduzido a haplótipos únicos usando a função hapCollapse (<http://github.com/legalLab/protocols-scripts>). Em seguida, foram geradas árvores filogenéticas ultramétricas no programa BEAST 2.5.1 (BOUCKAERT et al., 2014) sob o modelo de substituição de nucleotídeos TIM3 + G inferido como o melhor modelo de evolução molecular no programa JmodelTest

2.1.10 (POSADA, 2008). O relógio molecular utilizado foi o log normal relaxado não correlacionado e o modelo evolutivo coalescente de tamanho populacional constante seguindo Monaghan et al. (2009). Foram executadas três corridas independentes de 20.000.000 de gerações de MCMC com árvores e parâmetros amostrados a cada 2.000 gerações e, após verificar a convergência, as corridas foram combinadas no LogCombiner 2.5.1 (DRUMMOND et al., 2012). A convergência dos parâmetros e o tamanho efetivo da amostra (ESS > 200) foram verificados no Tracer 1.7 (RAMBAUT et al., 2018). Uma árvore de máxima credibilidade do clado foi obtida após o burn-in de 1.000 árvores usando TreeAnnotator (BOUCKAERT et al., 2014). Todas as análises foram feitas no R v3.6.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

Foram utilizados quatro métodos de delimitação de espécies de um único locus utilizando as sequências geradas neste projeto e as sequências do alto rio Doce provenientes do trabalho de SALES et al. (2018). Os métodos de delimitação utilizados foram: (1) GMYC, o modelo coalescente geral de Yule (FUJISAWA; BARRACLOUGH, 2013); (2) bGMYC, uma implementação bayesiana do GMYC (REID; CARSTENS, 2012); (3) mPTP, método de processos filogenéticos de Poisson com múltiplas taxas (KAPLI et al., 2017) e mínimo local (locMin), uma otimização de limite de distância e abordagem de agrupamento do pacote de software spider_1.3-0 (BROWN et al., 2012). Todas as análises foram realizadas no R 3.6.1. (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011). As metodologias seguiram os padrões preestabelecidos em Machado et al. (2018).

3.4.2 Genética de populações

Visando a realização do monitoramento genético-populacional, foram selecionadas previamente 18 espécies de famílias diferentes, potencialmente mais abundantes, migradoras e não migradoras. Para cada uma das espécies selecionadas, 30 ou mais amostras foram coletadas em oito pontos amostrais no baixo rio Doce, nos anos 1, 2 e 3. Entretanto, somente sete dessas espécies tiveram número amostral suficiente por ponto para a realização de análises genético-populacionais, para as quais foram desenvolvidos e genotipados marcadores moleculares microsatélites específicos, além de terem sido sequenciados os genes mitocondriais Citocromo Oxidase subunidade I (COI) e Citocromo b (Cytb), bem como os genes nucleares Myh6 e Glyt.

3.4.3 Marcadores Microsatélites

Foram desenvolvidos 20 loci de microsatélites para os Lambaris *Astyanax lacustris*, *Deuterodon intermedius* e *Knodus moenkhausii*, Acará *Geophagus brasiliensis*, Traíra *Hoplias malabaricus*, Curvina *Pachyurus adspersus* e Barrigudinho *Poecilia vivipara*, dos quais os 10 mais polimórficos foram selecionados. Esses *primers* foram desenhados a partir de uma corrida genômica prévia, na qual um indivíduo de cada espécie alvo foi incluído em uma biblioteca genômica seguindo o protocolo disponível no sítio eletrônico <https://github.com/legalLab>. Para *Poecilia vivipara*, os microsatélites foram filtrados e os *primers* heterólogos foram desenhados a partir de um genoma de referência, o genoma completo

de *Poecilia reticulata*, que se encontra depositado no GenBank (banco de dados genéticos públicos). A filtragem e o desenho dos *primers* heterólogos foram feitas utilizando o pipeline do programa MISA (BEIER et al., 2017). Os fragmentos com tamanho entre 100 e 280 pb e que continham microssatélites, foram anotados, incluindo as regiões flangeadoras dos microssatélites candidatos.

Dentre as características desejadas, os loci microssatélites deveriam ser simples (não compostos), do tipo dinucleotídeos (com motivo de repetição de dois nucleotídeos) e perfeitos (sem interrupções). Foram selecionados microssatélites perfeitos e com pelo menos 15 repetições. No caso de *Poecilia vivipara*, cujo genoma de referência estava disponível, foram selecionados os 1000 loci de microssatélites que melhor representavam todos os *linkage groups* do genoma, a fim de garantir uma melhor representatividade do genoma. Em seguida, esse conjunto de 1000 loci foi filtrado de acordo com as seguintes especificações: temperatura de anelamento do *primer* entre 59°C e 61°C, tamanho máximo do *primer* de 21 bp, número mínimo de repetições 15, número máximo de repetições 25, *primers* sem repetições ou homopolímeros, tamanho total do amplicon entre 195 e 235 bp.

Para *Poecilia vivipara* foram identificados, após essa filtragem, 51 pares de *primers*, dos quais 30 pares foram comprados. Para as demais espécies foram manufaturados 20 *primers*, os quais foram testados quanto sua efetividade de amplificação. Dentre estes, os 10 *primers* mais polimórficos e efetivos foram utilizados na amplificação de cada espécie separadamente. Em seguida, os produtos das amplificações de cada microssatélite foram misturados formando um pool para cada indivíduo. Esses *pools* foram purificados usando o método de purificação com esferas paramagnéticas (*beads*) a fim de eliminar os fragmentos pequenos e restos de reagentes que pudessem consumir os adaptadores na etapa seguinte. Posteriormente, foi feita a ligação dos adaptadores contendo as sequências identificadoras de cada indivíduo. Em cada uma das extremidades dos fragmentos foram ligados dois tipos de adaptadores, o adaptador A (N = 20) e o adaptador P1 (N = 20), respectivamente, de modo que o número de combinações de sequências identificadoras fosse correspondente ao número de combinações possíveis entre os diferentes adaptadores (N = 400). Assim, cada indivíduo recebeu uma combinação única de sequências identificadoras.

Após a ligação dos adaptadores, os *pools* de microssatélites por indivíduo foram purificados novamente e misturados de forma equimolar para a formação das bibliotecas genômicas de cada espécie. As bibliotecas então foram cortadas no Pippin prep (Saga Science), a fim de selecionar somente os fragmentos com tamanho ideal para processamento no sequenciador de Nova Geração (Next Generation Sequencing - NGS) ION TORRENT PGM. Por fim, um novo pool contendo todas as espécies foi formado para compor a biblioteca genômica final, sendo este aplicado em dois chips ION PGM 318 (Life Technologies™), cada um com capacidade de gerar aproximadamente 4.5 - 5 milhões de leituras únicas (*reads*). Portanto, a obtenção dos microssatélites de todas as espécies selecionadas para genética de populações foi obtida a partir de um único processamento de genotipagem por sequenciamento (Genotype-by-Sequencing - GBS) de microssatélites.

Foi desenvolvido um *pipeline* que aplica métodos de bioinformática de processamento de dados genéticos para automatizar a “extração” dos microssatélites obtidos através do NGS. Especificamente,

o *pipeline* separa todas as leituras (*reads*) de cada uma das sete espécies analisadas por meio das sequências dos *primers* específicos que foram desenhados para cada uma delas, permitindo no máximo três erros de sequenciamento (*mismatches*) para cada um dos *primers forward* e *reverse* utilizados. Em seguida, os *reads* de cada indivíduo são demultiplexadas por meio da identificação da sequência identificadora da espécie, permitindo, no máximo, um erro de sequenciamento para a sequência identificadora do adaptador A e nenhum erro para a sequência identificadora do adaptador P1. Estas sequências identificadoras (*barcodes*) foram sintetizadas juntamente com os adaptadores A e P1, de modo a permitir a demultiplexação das sequências *a posteriori*, via processamento de bioinformática. Ao final, foram criados arquivos FASTQ para cada um dos indivíduos genotipados, nos quais foram guardados todos os *reads* sequenciados de maneira individualizada.

Em seguida à individualização dos *reads* de cada indivíduo de cada espécie em arquivos FASTQ, foi implementado o *pipeline* SSRseq (LEPAIS et al., 2020), onde cada indivíduo foi genotipado através de uma série de análises automatizadas de bioinformática utilizando informações como a sequência dos *primers forward* e *reverse* de cada locus microssatélite, bem como o tipo e o tamanho da região repetitiva.

A fim de maximizar a performance na genotipagem dos alelos, todos os indivíduos foram genotipados utilizando o tamanho total da sequência (método *FullLength*) e o tamanho total da região repetitiva (método *RepeatFocused*). A comparação entre estes diferentes métodos de genotipagem permitem avaliar qual a melhor estratégia a ser adotada para um dado locus, permitindo aplicar diferentes estratégias e parâmetros para a genotipagem final. Para cada locus analisado, foi determinado um valor mínimo de 10 *reads* idênticos por indivíduo. Esse número mínimo de cobertura garante a confiabilidade dos alelos presentes na amostra, uma vez que alguns *reads* podem conter erros de sequenciamento (*indels*) que causam variações no tamanho das sequências e na composição da região repetitiva, não sendo esses considerados alelos distintos, mas sim artefatos do sequenciamento. Por esse motivo, quanto maior o número de *reads* de cada *locus*, maior a confiabilidade na estimativa dos alelos.

Por fim, o *pipeline* faz a tabulação dos alelos de cada *locus* de cada indivíduo das sete espécies analisadas, que são posteriormente convertidos para outros formatos de entrada para os programas de análises genético-populacionais utilizando o software R 4.1.1. Índices de diversidade gênica, número de alelos, índice de estrutura genética (FST), índice de endogamia (FIS) e índice de Garza-Williamson foram calculados através do software Arlequin 2.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

Além disso, foi realizada a Análise Discriminante de Componentes Principais (DAPC), implementada através da função 'dapc' do pacote 'adegenet', no software R 4.1.1. Este método consiste em investigar a estrutura genética entre grupos determinados *a priori*. Primeiramente é realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA) dos dados genéticos. Em seguida, os componentes principais da PCA são submetidos a uma Análise Discriminante Linear (LDA), sendo projetados nos eixos os discriminantes lineares que maximizam a separação entre os grupos pré-definidos.

3.4.4 Genes Mitocondriais e Nucleares

Para o sequenciamento dos genes mitocondriais - citocromo c oxidase subunidade I (COI) e citocromo b (Cytb) - e dos genes nucleares - glicosiltransferase (Glyt) e a subunidade alfa da cadeia pesada da miosina (Myh6) - no sequenciador de Nova Geração ION TORRENT PGM, foram desenhados *primers* específicos para cada gene contendo caudas compatíveis com os adaptadores A e P1 da plataforma ION TORRENT a partir de sequências previamente geradas neste projeto e também obtidas do GenBank, com tamanhos dos produtos de PCR entre 200 - 250 pares de bases, com sobreposição de bases entre as extremidades de fragmentos vizinhos.

Para garantir a eficiência destes *primers*, as sete espécies foram agrupadas em dois grupos com base em proximidade filogenética: Otophysi (*Astyanax lacustris*, *Deuterodon intermedius*, *Hoplias malabaricus*, *Knodus moenkhausii*) e Percomorpha (*Geophagus brasiliensis*, *Pachyurus adspersus*, *Poecilia vivipara*). Para cada grupo foram desenhados *primers* de COI (8 pares de *primers*), Cytb (16 pares), Glyt (12 pares) e Myh6 (10 pares). Para as reações de PCR, estes *primers* foram organizados em *pools*, de modo que os produtos de PCR fossem fisicamente distantes entre si, para não haver recombinação entre os fragmentos. Todas as amostras de DNA obtidas para genética de populações foram submetidas a reações de PCR para todos os *pools* de *primers* dos quatro genes em microplacas distintas.

Em seguida, três microlitros de cada produto de PCR foram transferidos para uma nova placa, onde foi realizada uma purificação utilizando *beads* paramagnéticas, com a finalidade de fazer uma seleção dos fragmentos de interesse e a remoção dos reagentes utilizados na PCR, seguida de uma reação de PCR para a incorporação dos adaptadores A e P1 da plataforma ION TORRENT PGM. Para a preparação das bibliotecas de genes para cada espécie, três microlitros de cada produto de PCR incorporado com adaptadores A e P1 foram reunidos em um microtubo de 1,5 mL e concentrados em um Concentrador a Vácuo Speedvac (Thermo Scientific), seguidos de uma purificação com *beads* paramagnéticas e seleção de tamanho de fragmentos de DNA na plataforma Pippin Prep (Saga Science).

As bibliotecas de genes de cada espécie foram então quantificadas utilizando a plataforma de quantificação de DNA Qubit (Thermo Scientific) e misturadas de forma equimolar para compor a biblioteca final, sendo estas aplicadas em dois chips ION PGM 318 (Thermo Scientific), cada um com capacidade de gerar entre 4.5 - 5 milhões de leituras únicas (*reads*), através da Plataforma Ion Chef (Thermo Scientific) e sequenciadas no sequenciador de próxima geração ION TORRENT PGM (Thermo Scientific). Para evitar eventuais dificuldades durante as etapas de demultiplexação das leituras, as espécies *Astyanax lacustris* e *Deuterodon intermedius* foram sempre injetadas em chips diferentes.

Como produtos do sequenciamento, foram obtidos arquivos BAM contendo as leituras brutas das bibliotecas injetadas nos chips. Estas leituras foram processadas através de uma série de ferramentas de bioinformática e scripts criados especificamente para o tratamento destes dados. Inicialmente foi

feita a conversão do formato BAM para FASTQ através da função 'bam2fq' do software samtools-1.14 (DANECEK et al., 2021), seguida de uma seleção de fragmentos de tamanho menor ou igual a 100 pb através da função 'Clean_fastq.py' (<https://github.com/legalLab/protocols-scripts/>). Os arquivos resultantes foram então processados no software R 4.1.1, onde foi utilizado o pacote 'rBLAST' (<https://github.com/mhahsler/rBLAST>) para demultiplexação dos dados brutos para cada espécie/gene a partir da montagem de uma biblioteca local contendo sequências de referência de genes de todas as espécies analisadas, considerando um percentual de identidade mínimo de 90% entre a leitura analisada e a sequência de referência. Como resultado, cada espécie analisada teve gerado quatro arquivos FASTQ, separados por gene (ex: *Astyanax lacustris* COI.fastq, *Astyanax lacustris* Cybt.fastq, *Astyanax lacustris* glyt.fastq, *Astyanax lacustris* Myh6.fastq). Ao total, 28 arquivos distintos foram gerados (7 espécies, 4 genes).

A extração de dados por indivíduo foi realizada a partir da filtragem das combinações únicas dos 400 barcodes presentes nas diferentes caudas dos adaptadores A e P1 através da ferramenta 'fqgrep' (<https://github.com/indranielfqgrep>), permitindo a existência de até 1 *mismatch* no barcode A e nenhum *mismatch* no barcode P1, onde para cada indivíduo foi criado um arquivo FASTQ contendo as leituras dos genes extraídos, em separado. Sendo assim, cada indivíduo possui quatro arquivos, um para cada gene. O alinhamento das leituras e montagem dos contigs foi realizada de maneira automatizada através de scripts utilizando o software 'Bwa-mem2' (<https://github.com/bwa-mem2/bwa-mem2>) e a função 'sam2consensus.py' (<https://github.com/edgardomortiz/sam2consensus>), onde a sequência consenso de cada indivíduo foi montada a partir das leituras mapeadas a uma sequência de referência. Estas sequências foram então agrupadas em um arquivo FASTA e alinhadas através do alinhador automático MAFFT v7.487 (KATO; STANDLEY, 2013).

Para as análises populacionais, foi utilizado o software Arlequin 2.5 (EXCOFFIER and LISCHER 2010). Também foram produzidas redes de haplótipos utilizando a função 'haploNet' do pacote 'pegas' (PARADIS, 2010) do software R 4.1.1.

3.4.5 Diversidade filogenética

A diversidade filogenética (PD) se trata de uma medição da biodiversidade baseada em filogenias. Para um dado grupo de espécies, a diversidade filogenética é igual à soma dos comprimentos de todos os ramos de uma árvore filogenética que abrangem o grupo de espécies analisadas.

Para a análise de diversidade filogenética, as sequências nas análises do DNA barcode foram selecionadas para compor um novo banco de dados contendo apenas uma única sequência representante de cada espécie para realizar uma reconstrução filogenética através do método de Máxima Verossimilhança no programa RAxML v8.0 (STAMATAKIS, 2014), usando o modelo de substituição nucleotídica GTR+I+G, selecionado no programa Modeltest 3.7 (POSADA, 2008). A árvore de máxima verossimilhança foi então utilizada como *input* para as análises de diversidade filogenética, calculada de acordo com o modelo proposto por FAITH (1992) através da função 'pd' do pacote 'picante'

(KEMBEL et al., 2010) do software R 4.1.1. As análises de PD foram realizadas para as comunidades de peixes de cada ponto amostrado, considerando tanto todas as espécies amostradas (exóticas e nativas) como somente as espécies nativas. Também foram estimadas as diferenças nos valores de PD entre os três anos de amostragem para os dois conjuntos de dados (exóticas + nativas | somente nativas) e entre as comunidades amostradas nas regiões do baixo e do alto rio Doce.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLSTROM, E. H.; MOSER, H. G. Eggs and larvae of fishes and their role in systematic investigations and in fisheries. **Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes**, v. 40, n.3, p. 379–398, 1976.

ANDRADE, M. C.; WINEMILLER, K. O.; BARBOSA, P. S.; FORTUNATI, A.; CHELAZZI, D., CINCINELLI, A.; GIARRIZZO, T. First account of plastic pollution impacting freshwater fishes in the Amazon: Ingestion of plastic debris by piranhas and other serrasalmids with diverse feeding habits. **Environmental Pollution**, v. 244, p. 766-773, 2019.

BASELGA, A. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity. **Global Ecology and Biogeography**, v. 19, n. 1, p. 134–143, 2010.

BASELGA, A. The relationship between species replacement, dissimilarity derived from nestedness, and nestedness. **Global Ecology and Biogeography**, v. 21, n. 12, p. 1223–1232, 2012

BASELGA, A.; ORME, D.; VILLEGGER, S.; BORTOLI, J.; LEPRIEUR, F. **betapart: Partitioning Beta Diversity into Turnover and Nestedness Components**. R package version 1.5.1, 2018. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=betapart>.

BEIER, S. et al. MISA-web: a web server for microsatellite prediction. **Bioinformatics**, v. 33, n. 16, p. 2583-2585, 2017.

BORCARD, D.; GILLET, F.; LEGENDRE, P. **Numerical Ecology with R**. Second Edition. Springer International Publishing, 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-71404-2.

BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS computational biology**, v. 10, n. 4, p. e1003537, 2014.

BROWN, S. D. J. et al. Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. **Molecular ecology resources**, v. 12, n. 3, p. 562-565, 2012.

CABACINHA, F. K. R. et al. Analysis of three sampling methods of early life history of fish in marginal lagoons of southeastern Brazil. **Fisheries Research**, v. 219, p. 1-5, 2019.

CALLISTO, M. FERREIRA, W. R.; MORENO, P.; GOULART, M.; PETRUCIO, M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 14, n. 1, p. 91-98, 2002.

CALLISTO, M.; MARQUES, M. M.; BARBOSA, F. A. R. Deformities in larval Chironomus (Diptera, Chironomidae) from the Piracicaba River, southeast Brazil. **Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie**, v. 27, n. 5, p. 2699-2702, 2000.

CENTRO DE REFERÊNCIA E INFORMAÇÃO AMBIENTAL (CRIA). Specieslink - simple search. Disponível em: <https://specieslink.net/>. Acessado em: 12 de novembro de 2021.

CENTRO DE TECNOLOGIA EM AQUICULTURA E MEIO AMBIENTE (CTA). **Peixes de água doce do Rio Doce: na área de influência da UHE Mascarenhas**. Vitória, 2009.

CHAO, A.; CHIU, C. **Nonparametric Estimation and Comparison of Species Richness**. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2016

CONVÊNIO-RENOVA-UFV. **A ictiofauna da bacia do Rio Doce após o rompimento da barragem de rejeito da Samarco, com foco em segurança alimentar**, 2019.

COSTA, C.; IDE, S.; SIMONKA, C. **Insetos imaturos. Metamorfose e Identificação**. Ribeirão Preto: Holos, 2006.

DANECEK, P. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools. **Gigascience**, v. 10, n. 2, p. giab008, 2021.

DE BRITTO, M. R. et al. **GUIA de Identificação das Espécies de PEIXES da Bacia do Rio das Pedras**, 2014.

DIAS, R. M.; ORTEGA, J. C. G.; STRICTAR, L.; DOS SANTOS, N. C. L.; GOMES, L. C.; DA LUZ-AGOSTINHO, K. D. G.; AGOSTINHO, C. S; AGOSTINHO, A. A. Fish trophic guild responses to damming: Variations in abundance and biomass. **River Research and Applications**, v. 36, n. 3, p. 430-440, 2020.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.

ECONSERVATION. **Programa de monitoramento da ictiofauna do Rio Doce nos Estados de Minas Gerais e Espírito Santo** – Atendimento a cláusula 164 do Termo de Transação de Ajustamento de Conduta Alínea A, Ofício SEI Nº 132/2016-DIBIO/ICMBIO. Relatório Final. Relatório Técnico – RT ECV 260/18. Maio 2019

ESRI. **ArcGis Desktop v.10.4**. CA: Environmental Systems Research Institute, 2016.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FAITH, D. P. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. **Biological conservation**, v. 61, n. 1, p. 1-10, 1992.

FAITH, D. P.; Reid, C. A. M.; Hunter, J. Integrating phylogenetic diversity, complementarity, and endemism for conservation assessment. **Conservation Biology**, n. 18, v. 1, p. 255-261, 2004.

FERREIRA, W. R.; PAIVA, L. T.; CALLISTO, M. Development of a benthic multimetric index for biomonitoring of a neotropical watershed. **Brazilian Journal of Biology**, 71, n 1, p. 15-25, 2011.

FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de Peixes Marinhos do Sudeste do Brasil**. II Teleostei. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade São Paulo, 1980.

FISCHER, L. C.; PEREIRA, L. E. D.; VIEIRA, J. D. **Peixes Estuarinos e Costeiros**. Rio Grande: Luciano Gomes Fischer, 2011.

FRIAS-TORRES, S. Notes on aquarium brood release and feeding of the opossum pipefish, *Microphis brachyurus lineatus*. **Gulf and Caribbean Research**, v. 16, n. 1, p. 73-75, 2004.

FRICKE, R. et al. (Org.). **Eschmeyer's Catalog of fishes: genera, species, references**. Disponível em: <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Acesso em: 12 de novembro de 2021.

FUJISAWA, T.; BARRACLOUGH, T. G. Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. **Systematic biology**, v. 62, n. 5, p. 707-724, 2013.

FUNDAÇÃO RENOVA. **Programa de monitoramento da ictiofauna do Rio Doce nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo** – atendimento a cláusula 164 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta Alínea A, ofício SEI nº 132/2016- DIBIO/ICMBIO – Relatório Final. Relatório Técnico – RT ECV 260/18, 2019.

HAHN, N. S., AGOSTINHO, A. A., GOMES, L. C., BINI, L. M. Estrutura trófica da ictiofauna do reservatório de Itaipu (Paraná-Brasil) nos primeiros anos de sua formação. **Interciência**, v. 23, n. 5, 1998.

HAHN, N. S.; DELARIVA, L. R. Métodos para avaliação da alimentação natural de peixes: o que estamos usando? **Interciência**, v. 28, n. 2, p 100-104, 2003.

HALLETT, L. et al. **codyn: Community Dynamics Metrics R package version 2.0.5**, 2020. DOI: 10.5063/F1N877Z6. Disponível em: <https://github.com/NCEAS/codyn.d>

HAMADA, N.; NESSIMIAN, J. L.; QUERINO, R. B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Editora do INPA, Manaus, 2014.

HELLAWELL, J. M.; ABEL, R. A rapid volumetric method for the analysis of the food of fishes. **Journal of fish Biology**, v. 3, n. 1, p. 29-37, 1971.

HYSLOP, E. J. Stomach contents analysis – a review of methods and their application. **Journal of Fish Biology**, v. 17, n. 4, p. 411-429, 1980.

ICMBio. **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Disponível em: http://icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/publicacoes/publicacoes-diversas/livro_vermelho_2018_vol1.pdf. Acessado em: 13 de outubro de 2020.

JOBLING, M. **Environmental factors and rates of development and growth**. In: HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. (Org.). Handbook of fish biology and fisheries. Fish biology. USA: Blackwell, p. 97-122, 2002.

KAPLI, P. et al. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. **Bioinformatics**, v. 33, n. 11, p. 1630-1638, 2017.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KEMBEL, S. W. et al. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. **Bioinformatics**, v. 26, n. 11, p. 1463-1464, 2010.

KINDT, R.; COE, R. **Tree diversity analysis. A manual and software for common statistical methods for ecological and biodiversity studies** Nairobi, Agroforestry Centre (ICRAF), 2005. Disponível em: <http://www.worldagroforestry.org/output/tree-diversity-analysis>.

KUMAR, S. et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. **Briefings in bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 299-306, 2008.

LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). **Journal of Animal Ecology**, v. 20, p. 201-219, 1951.

LEGENDRE, Pierre. A temporal beta-diversity index to identify sites that have changed in exceptional ways in space-time surveys. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 6, p. 3500-3514, 2019. DOI: 10.1002/ece3.4984.

LEPAIS, O. et al. Fast sequence-based microsatellite genotyping development workflow. **PeerJ**, v. 8, p. e9085, 2020.

MACHADO, V. N. et al. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 53, de 1º de setembro de 2020. Define o nome comum e respectivos nomes científicos para as principais espécies de peixes de interesse comercial destinados ao comércio nacional. Diário Oficial, 2020.

MEDEIROS, A. P. M. D.; XAVIER, J. H. D. A.; ROSA, I. M. D. L. Diet and trophic organization of the fish assemblage from the Mamanguape River Estuary, Brazil. **Latin american journal of aquatic research**, v. 45, n. 5, p. 879-890, 2017.

MERRITT, R. M.; CUMMINS, K. W. **An introduction to the aquatic insects of North America**. Iowa: Kendall Hunt, 1996.

MONAGHAN, M. T. et al. Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic biology**, v. 58, n. 3, p. 298-311, 2009.

MUGNAI, R.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. **Manual de identificação de macroinvertebrados aquáticos do Estado do Rio de Janeiro: para atividades técnicas, de ensino e treinamento em programas de avaliação da qualidade ecológica dos ecossistemas lóticos**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2010.

NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce: Desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá, PR: Eduem, 2001.

OKSANEN, J. et al. **vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.5-7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2020.

PARADIS, E. *pegas*: an R package for population genetics with an integrated–modular approach. **Bioinformatics**, v. 26, n. 3, p. 419-420, 2010.

PEREIRA, R. A. C.; RESENDE, E. K. **Alimentação de *Gymnotus cf. carapo* (Pisces: Gymnotidae) e suas relações com a fauna associada às macrófitas aquáticas no Pantanal, Brasil**. Corúmba: Embrapa Pantanal-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 2006

POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

PROVETE, D. B., SILVA, F. R.; SOUZA, T. G. Estatística aplicada à ecologia usando o R. PPG Biologia Animal. UNESP, p. 122, 2011.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021. URL <https://www.R-project.org/>.

REID, N. M.; CARSTENS, B. C. Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. **BMC evolutionary biology**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2012.

Relatório Técnico DEAMB/SEMAD/SISEMA Nº 011/2016.

SALES, N. G. et al. Hidden diversity hampers conservation efforts in a highly impacted Neotropical river system. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 271, 2018.

SANTOS, A. J. Estimativas de riqueza em espécies. In: Rudran, R., Cullen, L. Valladares-Padua, C. (Orgs.) Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre. **Ed. da Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, p. 19-41, 2003.

SANTOS, M. N.; ROCHA, G. R. A. Dieta e hábitos alimentares de *Eucinostomus gula* (Quoy & Gaimard, 1824) em Itacaré, sul da Bahia. **Anais do VIII CEB**. Caxambu-MG, 2007.

SILVANO, R. A. Feeding habits and interspecific feeding associations of *Caranx latus* (Carangidae) in a subtropical reef. **Environmental Biology of Fishes**, v. 60, n. 4, p. 465-470, 2001.

SILVEIRA, E. L.; ARANHA, J. M. R.; MENEZES, M. S.; VAZ-DOS-SANTOS, A. M. Reproductive dynamics, age and growth of *Astyanax aff. fasciatus* in a Neotropical basin. **Marine and Freshwater Research**, v. 71, p. 670–683, 2020.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

TANAKA, S. Stock assessment by means of ichthyoplankton surveys. **FAO Fisheries Technical Paper**, v. 122, p. 33–51, 1973.

VAZZOLER, A. E. A. DE M. 1981. **Manual de métodos para estudos biológicos de população de peixes. Reprodução e crescimento**. Brasília: CNPq – Programa Nacional de Zoologia. 108p. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá, EDUEM. 169p.

VIEIRA, F. Distribuição, impactos ambientais e conservação da fauna de peixes da bacia do Rio Doce. **MG Biota**, v. 2, p. 5-22, 2010.

VIEIRA, F. et al. **Peixes do Quadrilátero Ferrífero – Guia de Identificação**. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 208p, 2015.

VIEIRA, F.; GASPARINI, J. L.; MACIEIRA, R. M. **Guia Ilustrado dos Peixes da Bacia do Rio Benevente - ES**. Vitória: ACQUA Consultoria e Recuperação de Ambientes Aquáticos Ltda/São Joaquim Energia S. A, 2014. HEBERT, P.D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.