

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

**A7MICS11– Material Suplementar 11**

**Anexo 7 Marinho**

**RT-39 RRDM/FEV 22**

**RA2021 PMBA/Fest-RRDM**

Vitória,

Fevereiro de 2022

## 1 METODOLOGIA DO AMBIENTE MARINHO – ANEXO 7

Com o objetivo de monitorar diversos aspectos ecológicos da ictiofauna estuarina/marinha e recifal, e da carcinofauna estuarina/marinha após o Rompimento da Barragem de Fundão (Mariana/MG), pontos de amostragem foram distribuídos ao longo da costa. Os pontos foram distribuídos entre o sul da Bahia (Caravelas), incluindo Abrolhos, e a região centro-norte do Espírito Santo (até Aracruz). Esta amostragem visou abranger a área atingida diretamente pela lama de rejeito de minério de ferro (baixo Rio Doce, distante cerca de 3 km da foz, e área marinha adjacente) e áreas consideradas referência, que sofreram menor impacto do rejeito.

Além do Rio Doce (município de Linhares/ES, distrito de Regência) e área marinha adjacente, ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas foram estudadas nos estuários dos rios Caravelas (Caravelas/BA), São Mateus (Conceição da Barra/ES), Ipiranga (São Mateus/ES, distrito de Urussuquara) e Piraquê-Açu (Aracruz/ES, distrito de Santa Cruz). Para tanto, foram empregadas redes de arrasto de fundo com portas (três arrastos em cada ponto, sendo seis pontos em cada estuário, dois na área externa e quatro na interna, totalizando 90 arrastos/mês). Visando descrever o recrutamento larval de peixes estuarinos foram utilizadas as mesmas regiões amostradas para a ictiofauna e carcinofauna de substratos inconsolidados, com exceção dos rios Ipiranga e Caravelas que foram substituídos pelo rio Piraquê-Açu e rio Mucuri, respectivamente, devido à profundidade de operação das armadilhas luminosas (ver Protocolo Recrutamento pós-larvas), sendo ao total quatro estuários denominados como segue: Local Impacto=Rio Doce, Locais controles C1=rio Piraquê-Açu, C2=rio São Mateus e C3=rio Mucuri. Em contrapartida, as amostragens do monitoramento referentes ao recrutamento larval de peixes recifais foram realizadas de forma concomitante com as saídas de censo visuais em quatro localidades: CA-Recifes de Coroa Vermelha e Nova Viçosa denominado como “Cassurubá”; PP-Parcel das Paredes; ABR-Arquipélago dos Abrolhos e PAB-Parcel dos Abrolhos (Protocolo Recrutamento pós-larvas). Ainda que sejam os mesmos pontos das campanhas do censo visual, optou-se por usar nomenclatura diferente para distinguir os planos de amostragem.

O estudo de telemetria de peixes estuarinos/marinhas foi desenvolvido nos estuários dos Rios Doce e São Mateus e áreas marinhas adjacentes. Para as análises de microquímica de otólitos, os exemplares de peixes são provenientes tanto das coletas utilizadas para os estudos da ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas, quanto de aquisição em peixarias de quatro estuários amostrados: Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Doce.

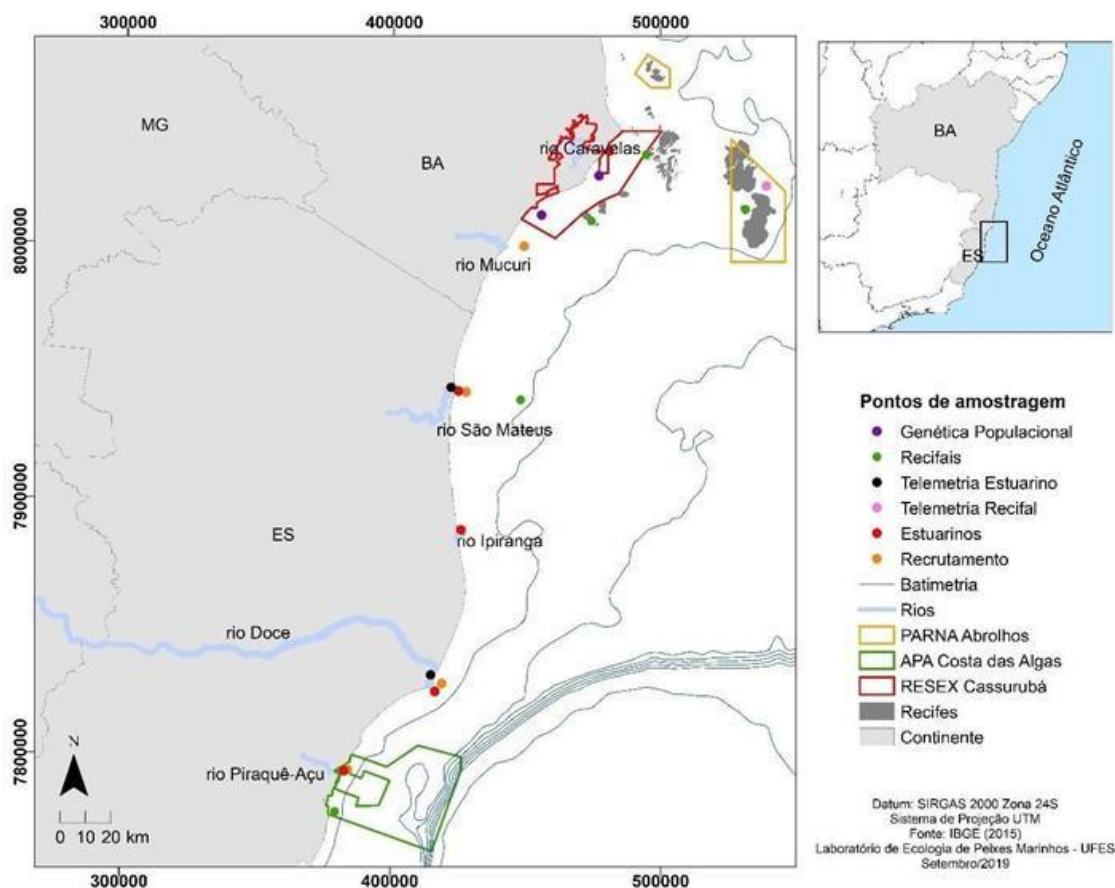
Os estudos de genética de populações foram realizados coletando-se amostras de peixes recifais e estuarinos. Para os peixes estuarinos as amostras foram coletadas concomitantemente com as campanhas dos estudos de ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas, nos rios: rio Caravelas (CA), Rio Doce (DO), rio Ipiranga (IP) e São Mateus (SM). Para os peixes recifais foram delimitadas quatro áreas ao longo da área de abrangência do PMBA/Fest-RRDM sendo: A1 -Norte de Abrolhos

e Royal Charlotte, A2 - Sul do banco de Abrolhos, A3 - Plataforma estreita entre Linhares e Piúma, A4 - Marataízes e norte do RJ (ver Protocolo Genética de Populações).

Visando os estudos de censo visual (ver Protocolo Censo Visual), as localidades foram amostradas e classificadas segundo a sua distância da foz do Rio Doce utilizando um desenho de impacto de impacto Beyond-BACI (Before After Control Impact) proposto por UNDERWOOD (1992). A área de estudo contém cinco localidades: impacto - APA Costa das Algas e REVIS Santa Cruz (denominada daqui em diante de “APA Costa das Algas” e referida nas figuras como “I”), o Controle I – denominado Recifes Esquecidos (e indicado nas figuras como “C1”), Controle II – Recifes da RESEX Cassurubá (Recifes de Sebastião Gomes, Coroa Vermelha e Nova Viçosa); (denominado daqui em diante como “Cassurubá” e referida nas figuras como “C2”), Controle III – Parcel das Paredes (denominado como “Paredes” e indicado nas figuras como “C3”) e o Controle IV – PARNA Abrolhos (denominado “Abrolhos” e indicado nas figuras como “C4”). Já o estudo de telemetria de peixes recifais, a área de amostragem e monitoramento se restringe ao Parque Nacional Marinho dos Abrolhos.

Os pontos amostrados em todos os subprojetos do Anexo 7, entre outubro/2018 e julho/2021, encontram-se na Figura 1 e mais detalhes podem ser encontrados nas seções de cada subprojeto.

Figura 1: Mapa da área de estudo exibindo os locais amostrados durante os estudos da ictiofauna estuarina/marinha e recifal, além da carcinofauna estuarina/marinha, nas áreas direta e indiretamente impactadas pela lama de rejeitos de minério provenientes do Rompimento da Barragem de Fundão (Mariana/MG). Diversos aspectos ecológicos das comunidades e populações dos peixes e crustáceos foram estudados entre outubro/2018 e fevereiro/2020



## 2 ICTIOFAUNA E CARCINOFAUNA ESTUARINA/MARINHA

### 2.1 ÁREA DE ESTUDO

Para a descrição da ictiofauna e carcinofauna estuarina/marinha de substrato inconsolidado, foram realizadas amostragens mensais (Ano 1, entre outubro/2018 e setembro/2019) e trimestrais (novembro e dezembro/2019; fevereiro/2020; janeiro, maio e julho/2021) na porção do baixo Rio Doce e sua área marinha adjacente (local do impacto). Além disso, representando um gradiente de impacto, foram também amostrados os estuários e áreas marinhas adjacentes aos rios Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açu. Em cada estuário, foram estudados dois pontos internos, localizados a 2 e 4 km da foz, e quatro pontos externos (área marinha adjacente), sendo o primeiro localizado a 2 km da foz e os demais a 4 km da foz, em forma de cruz. Visando a integração entre Anexos e a investigação acerca de potenciais impactos do rejeito nas assembleias de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos, foram adicionados 11 pontos de coleta à malha amostral do Anexo 7 a partir de dezembro/2019, aqui chamados “Pontos novos”, todos localizados em áreas externas

aos estuários (Figura 2). Estes pontos são também monitorados quanto à presença de indicadores do rejeito (por exemplo, Fe, Mn, As e Cr, entre outros) pela equipe do Anexo 3 do PMBA/Fest-RRDM. Por meio da integração de dados entre Anexos, no futuro será possível determinar o efeito relativo do rejeito e de variáveis ambientais, tais como profundidade, salinidade e temperatura da água, na composição das assembleias de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos na área impactada. Além disso, os pontos RD7, RD8 e RD9 foram excluídos das amostragens, uma vez que estes pontos se encontravam em profundidades muito maiores que os demais, dificultando a operação da rede de arrasto de fundo, causando viés nas amostragens e impossibilitando comparações com os demais estuários. Os pontos amostrados no Ano 1 estão na Tabela 1 e aqueles amostrados na Transição estão na Tabela 2.

Devido a pandemia de COVID-19, os trabalhos de campo e laboratório foram interrompidos entre março e dezembro/2020, visando a preservação da saúde não só dos membros das equipes, mas também das comunidades das localidades onde os estudos foram desenvolvidos.

Figura 2: Mapa da área de estudo exibindo os locais amostrados durante os estudos da ictiofauna e carcinofauna estuarinas/marinhas nas regiões direta (Rio Doce e área marinha adjacente) e indiretamente impactadas (rios Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açu), entre outubro/2018 e julho/2021

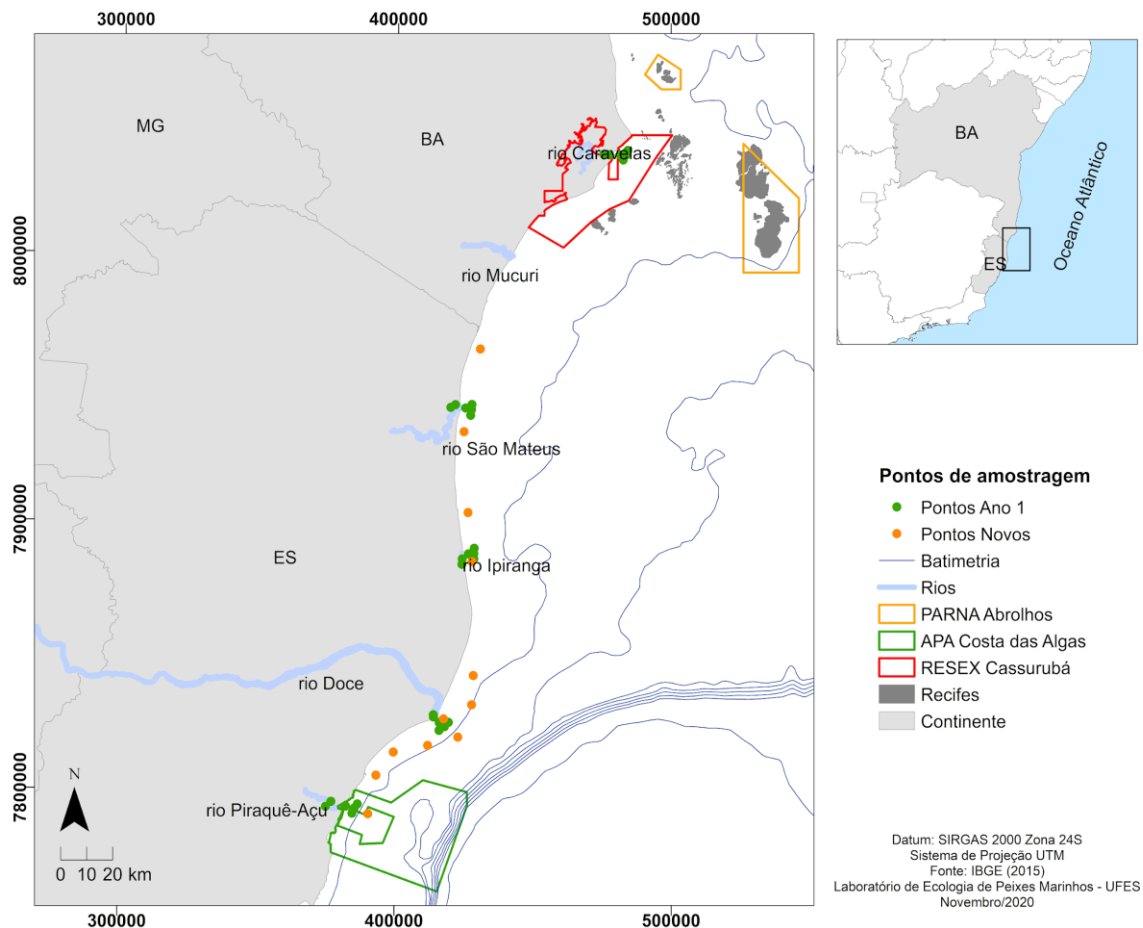


Tabela 1: Pontos de amostragem de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos durante o ano 1 (outubro/2018 a setembro/2019), entre o sul da Bahia e o norte do Espírito Santo. \*\*\*\*indicam os pontos excluídos das amostragens no período após o ano 1

Nome da estação amostral	Código da estação amostral	Northing	Easting
São Mateus	SM01	7942784,4	419729,6
São Mateus	SM02	7943784,9	421452,8
São Mateus	SM03	7942551,0	425158,0
São Mateus	SM04	7941979,6	427287,0
São Mateus	SM05	7943853,6	427435,5
São Mateus	SM06	7939871,0	426992,1
Ipiranga	IP01	7884327,8	424013,5
Ipiranga	IP02	7886336,0	424094,3
Ipiranga	IP03	7888255,9	426353,1
Ipiranga	IP04	7888328,9	428344,3
Ipiranga	IP05	7890307,3	428450,3
Ipiranga	IP06	7886351,4	428323,1
Caravelas	CA1	8037150,9	475405,8
Caravelas	CA2	8037053,4	477401,9
Caravelas	CA3	8036975,5	481416,7
Caravelas	CA4	8036824,6	483414,2
Caravelas	CA5	8038597,4	484155,2
Caravelas	CA6	8035062,5	482490,6
Piraquê-Açú	PA0	7793915,0	375019,0
Piraquê-Açú	PA01	7795798,0	377029,0
Piraquê-Açú	PA03	7794035,0	382331,0
Piraquê-Açú	PA04	7793323,0	385460,0
Piraquê-Açú	PA05	7794865,0	386549,0
Piraquê-Açú	PA06	7791417,0	384598,0
Rio Doce	RD01	7828224,0	413859,0
Rio Doce	RD02	7827448,0	413884,0
Rio Doce	RD03	7825335,0	416012,0
Rio Doce	RD04	7823800,0	417877,0
Rio Doce	RD05	7825443,0	419357,0
Rio Doce	RD06	7822434,0	415948,0
Rio Doce	RD07****	7818070,3	423673,4
Rio Doce	RD08****	7827151,7	427261,9
Rio Doce	RD09****	7812452,2	415382,8

Tabela 2: Pontos de amostragem de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos após o ano 1 (novembro e dezembro/2019; fevereiro/2020; janeiro, maio e julho/2021), entre o sul da Bahia e o norte do Espírito Santo. \*\*\*\*indicam os pontos incluídos nas amostragens após o ano 1 (Pontos novos)

Nome da estação amostral	Código da estação amostral	Northing	Easting
São Mateus	SM01	7942784,4	419729,6
São Mateus	SM02	7943784,9	421452,8
São Mateus	SM03	7942551,0	425158,0
São Mateus	SM04	7941979,6	427287,0
São Mateus	SM05	7943853,6	427435,5
São Mateus	SM06	7939871,0	426992,1
São Mateus	ITA01****	7964547,0	430449,0
São Mateus	CB01****	7933756,0	424570,0
Ipiranga	IP01	7884327,8	424013,5
Ipiranga	IP02	7886336,0	424094,3
Ipiranga	IP03	7888255,9	426353,1
Ipiranga	IP04	7888328,9	428344,3
Ipiranga	IP05	7890307,3	428450,3
Ipiranga	IP06	7886351,4	428323,1
Ipiranga	BN02****	7903598,0	426147,0
Ipiranga	BS01****	7885331,0	427648,0
Rio Doce	SDN13****	7842923,0	428269,0
Rio Doce	SDN30****	7832036,1	427721,0
Rio Doce	SD03****	7819937,0	422769,0
Rio Doce	SDS20****	7816813,0	411879,0
Caravelas	CA1	8037150,9	475405,8
Caravelas	CA2	8037053,4	477401,9
Caravelas	CA3	8036975,5	481416,7
Caravelas	CA4	8036824,6	483414,2
Caravelas	CA5	8038597,4	484155,2
Caravelas	CA6	8035062,5	482490,6
Piraquê-Açú	PA0	7793915,0	375019,0
Piraquê-Açú	PA01	7795798,0	377029,0
Piraquê-Açú	PA03	7794035,0	382331,0
Piraquê-Açú	PA04	7793323,0	385460,0
Piraquê-Açú	PA05	7794865,0	386549,0
Piraquê-Açú	PA06	7791417,0	384598,0
Rio Doce	RD01	7828224,0	413859,0
Rio Doce	RD02	7827448,0	413884,0
Rio Doce	RD03	7825335,0	416012,0
Rio Doce	RD04	7823800,0	417877,0
Rio Doce	RD05	7825443,0	419357,0
Rio Doce	RD06	7822434,0	415948,0



Nome da estação amostral	Código da estação amostral	Northing	Easting
(Ponto novo)	CA 02****	7791253,0	390338,0
(Ponto novo)	SDS19****	7805649,0	393211,0
(Ponto novo)	SDS13****	7814269,0	399459,0
(Ponto novo)	SD 01****	7826708,0	417558,0

## 2.2 COLETA DE DADOS

### 2.2.1 Variáveis ambientais

Antes do início de cada arrasto foram mensuradas as seguintes variáveis ambientais: temperatura (°C), profundidade (m), salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD - ppm) da água. Para tanto, foi utilizada uma sonda multiparâmetros Horiba modelo U-52G (Figura 3). Para as medidas de fundo, a água foi coletada com auxílio de uma garrafa de Van Dorn.

Figura 3: Coleta de dados em campo para mensuração das variáveis ambientais utilizando sonda multiparâmetro



### 2.2.2 Amostragem de ictiofauna e carcinofauna

Em cada ponto amostral, foram empregados três arrastos de cinco minutos cada, utilizando-se uma rede de arrasto de fundo com portas (tipo “balão” ou “wing trawl”), com as seguintes especificações: tralha superior PES 5mm com 8,62m de comprimento e tralha inferior PES 8mm com 10,25m de comprimento; peso do chumbo equivalente a 1,62kg, sendo 27 unidades de 60g; malha 13mm, fio 210/09 nas mangas e barriga; malha 5mm, fio 210/12 no saco. As portas são de madeira vazada com as dimensões de 70cm x 42cm e peso de 9,3 kg cada. A velocidade média dos arrastos foi padronizada em 3,7km/h (*i.e.* 2 mn/h).

Após a coleta, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína até eutanásia e em seguida acondicionados em sacos plásticos devidamente identificados quanto ao ponto, arrasto, local e data de coleta. O material foi mantido resfriado e encaminhado para os laboratórios responsáveis, onde foram preservados congelados até o seu processamento.

No laboratório, os peixes foram medidos quanto ao comprimento total (CT, o mais próximo de 1 mm, tomado da ponta do focinho à extremidade da cauda) utilizando um ictiômetro. Para os camarões foram mensurados o comprimento da carapaça – CC (da região intraorbital à margem posterior) e o comprimento total – CT (da região da extremidade do rostro até a extremidade do télson) com auxílio de paquímetro (o mais próximo de 1 mm). Para os siris/caranguejos foram medidos o comprimento da carapaça – CC (do rostro à margem posterior da carapaça entre os últimos espinhos) e a largura da carapaça – LC (das margens da carapaça entre os últimos espinhos laterais), enquanto para os caranguejos, foram medidos LC e CC na porção mediana da carapaça, tanto longitudinalmente quanto transversalmente. Além disso, peixes e crustáceos foram pesados (o mais próximo de 0,01g).

## 2.3 ANÁLISES DE DADOS

### 2.3.1 Comunidades e populações de peixes e crustáceos estuarinos/marinhos

O cálculo da densidade (número de indivíduos - n) e biomassa (g) de peixes e crustáceos por unidade de área (CPUA - Captura por Unidade de Área) foi feito dividindo-se a captura pela área varrida pela rede, multiplicadas por 100. A área varrida pela rede foi calculada por  $A = D \cdot 10,25 \cdot 0,5$ , onde: A=área varrida em metros; D=distância percorrida pela rede; 10,25 é o comprimento da corda da parte inferior da rede; 0,5 é o fator equivalente a área varrida no arrasto, conforme BARLETTA et al. (2005). Assim, a densidade foi expressa em número de indivíduos/100m<sup>2</sup>, enquanto a biomassa foi expressa em g/100m<sup>2</sup>.

Foram calculadas médias por área (interna, pontos 0 - apenas para o Piraquê-Açú, 1 e 2 (exceto Piraquê-Açú); externa – pontos 3, 4, 5 e 6) para cada estuário (Rio Doce, Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açú) dos indicadores da comunidade: densidade, biomassa, riqueza (número de espécies/100m<sup>2</sup>), diversidade de Shannon-Wiener ( $H' \log_e$ ) e equitatividade de Pielou ( $J'$ ). Os períodos avaliados são assim constituídos: Ano 1 = Chuvoso1 – C1 (dezembro/2018 e fevereiro/2019); Seco1 – S1 (maio e julho/2019); Ano 2 = Chuvoso2 – C2 (novembro/dezembro de 2019 e fevereiro/2020); Seco2 – S2 (não amostrado devido à pandemia de COVID-19); Ano 3 = Chuvoso3 – C3 (janeiro/2021 – não incluído para não desequilibrar as análises); Seco3 – S3 (maio e julho/2021).

Para detectar se houve diferenças espaço-temporais significativas nos indicadores das comunidades de peixes e crustáceos, os dados foram avaliados usando um modelo linear multifatorial de efeitos mistos (Análise de variância multivariada permutacional – PERMANOVA) (ANDERSON et al., 2008), a partir de matrizes de similaridade de Bray-Curtis (dados multivariados) ou distância Euclidiana

(dados univariados). Para ambos, foram considerados quatro fatores: “Local” (fixo, Impacto: Rio Doce; Controles: Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açú); “Estuário” (aleatório, Rio Doce, Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açú, aninhados em Local); “Área”, (aleatório, Externa e Interna, aninhado em Estuário); e **Período** (fixo, C1, S1, C2 e S3). Utilizou-se nestas análises a soma dos quadrados do Tipo III (parcial) e 9999 permutações dos resíduos sob o modelo reduzido (ANDERSON, 2017). Quando diferenças significativas foram detectadas, o teste “*a posteriori*” pareado, da mesma rotina, foi empregado. Para as análises multivariadas de densidade e biomassa, os dados foram previamente transformados em raiz quarta, visando reduzir a influência de espécies dominantes no cálculo das matrizes de similaridade. Para as análises univariadas, os dados de densidade e biomassa foram transformados em Log (x+1). Os padrões espaciais e temporais da estrutura das comunidades foram representados por meio do cálculo dos centróides para Área x Período e análises de coordenadas principais (PCO).

Modelos de regressão lineares baseados em distâncias (DistLMs) foram usados para analisar a relação da estrutura das comunidades com as variáveis ambientais (profundidade, salinidade, temperatura, oxigênio dissolvido e pH). Tais análises foram realizadas considerando as variáveis ambientais separadamente (testes marginais) e coletivamente (testes condicionais). Os testes condicionais foram feitos usando o procedimento de seleção *Best* e o critério de informação de Akaike (AIC), que balanceia a explicação do modelo ( $R^2$ ) com o número de preditores incluídos. Os DistLMs foram baseados nos dados ambientais normalizados, transformados em Log (x + 1) (apenas oxigênio dissolvido e turbidez) após visualização com auxílio de Draftsman plots, e nas matrizes de similaridade de Bray-Curtis para densidade e biomassa transformados em raiz quarta. Os modelos selecionados foram visualizados por meio de análises de redundância baseada em distância (db-RDA) (MCARDLE & ANDERSON, 2001).

Informações adicionais sobre os procedimentos de campo e laboratório, e análise de dados estão disponíveis nos arquivos “Protocolos de análises RRDM” e “Protocolos de amostragens RRDM”.

### 3 DNA BARCODING

Os peixes estuarinos coletados foram provenientes de campanhas realizadas pelo Laboratório de Ecologia de Peixes Marinhos (CEUNES/UFES) durante o período de setembro de 2018 a setembro de 2021 em sete unidades amostrais: Rio Barra Nova, Rio Doce, Rio Ipiranga, Rio Itaúnas, Rio São Mateus, Rio Caravelas e Rio Piraquê-Açú. Os peixes recifais foram coletados pelo Laboratório de Ecologia e Conservação Marinha (LECoMar) – UFSB por meio de visitas a desembarques pesqueiros no estado do Espírito Santo, a fim de obter amostras provenientes da pesca de espinhel de fundo, de quatro regiões que ocorrem entre o sul da Bahia e norte do Rio de Janeiro: Área 1, Norte de Abrolhos e Royal Charlotte; Área 2, Sul do Banco de Abrolhos; Área 3, Plataforma estreita entre Linhares e Piúma; e Área 4, Marataízes e norte do Rio de Janeiro.

As coletas de tecido dos peixes estuarinos, para as análises de DNA *Barcoding* e análises genéticas populacionais, foram realizadas pelo Laboratório de Genética e Conservação Animal (LGCA) do CEUNES, UFES; e a coleta dos tecidos de peixes recifais foi realizada pelo Laboratório de Ecologia e Conservação Marinha (LECoMar) – UFSB. Dos peixes estuarinos foi retirada uma pequena amostra de tecido muscular e dos peixes recifais uma pequena porção do raio da nadadeira caudal. Os fragmentos de tecidos coletados foram armazenados em microtubos contendo álcool 96% e acondicionados a -20°C no banco de tecidos do LGCA. Todos os microtubos foram identificados e etiquetados com todas as informações necessárias do indivíduo, como a sigla da espécie (identificação morfológica), o arrasto, o ponto, o rio e a data de coleta, conforme o exemplo abaixo (Figura 4).

Figura 4: Exemplo de etiqueta contendo todas as informações necessárias dos peixes marinhos. Indivíduo da espécie *Diapterus rhombeus* coletado no Rio São Mateus em 16 de novembro de 2018



O DNA das amostras foi extraído a partir do protocolo de solução salina (Bruford et al., 1992) e quantificado em espectrofotômetro. As soluções de DNA extraído foram diluídas para 20 ng/μL para padronizar as reações e evitar possíveis erros de amplificação devido ao excesso de material genético.

Para a amplificação do Citocromo Oxidase Subunidade I (COI), foram utilizados os seguintes primers: FishF1- 5'TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3' e FishR2- 5'ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA3' (Ward et al. 2005). Depois de amplificados, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose (1%) corados com Gelred, visualizados e fotografados sob UV. Após a amplificação dos fragmentos de DNA, as reações foram purificadas utilizando a enzima ExoSap-IT e enviadas para sequenciamento em uma empresa terceirizada. Todas as sequências geradas foram editadas manualmente e alinhadas com o auxílio da ferramenta Muscle, utilizando o programa MEGA 7.026 (Kumar et al. 2016). Em seguida, as sequências geradas foram comparadas com sequências previamente publicadas em dois bancos de dados online,

GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank)) e BOLD ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)). A comparação com esses bancos de dados genéticos nos permite identificar o grau de homologia entre a sequência que possuímos e as sequências depositadas. O grau de homologia nos fornece uma porcentagem que varia entre 0% a 100%, e quanto maior esse valor maior a proximidade genética existente entre as sequências. Além da comparação com os bancos de dados, um arquivo com as sequências analisadas foi produzido e a partir deste, utilizando-se o software MEGA 7.026 foi gerada uma árvore de Neighbor-Joining (Saitou et al. 1987) com base no modelo de substituição de parâmetros Kimura-2 (K2P) (KIMURA, 1980). A confiança dos ramos foi verificada a partir dos valores de *Bootstrap* com 10000 repetições (Felsenstein, 1985).

Após a comparação com os bancos de sequências e a análise da árvore de Neighbor-Joining as sequências foram classificadas como congruentes ou incongruentes. As amostras classificadas como congruentes foram aquelas cuja identificação molecular da espécie correspondeu à identificação morfológica, considerando um grau de homologia entre 99% e 100%, em pelo menos um dos bancos de dados e a árvore de distância genética. As amostras incongruentes foram aquelas cuja identificação molecular não correspondeu à identificação morfológica, considerando a comparação com os bancos de dados e a árvore de Neighbor-Joining.

## 4 RECRUTAMENTO DA ICTIOFAUNA

### 4.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

A malha amostral não sofreu modificação durante o período de transição. Para o monitoramento do recrutamento larval de peixes nos ambientes estuarinos, quatro regiões foram amostradas: foz do Rio Doce (zona Impacto), foz do rio Piraquê-Açú (Controle 1), foz do rio São Mateus (Controle 2) e foz do rio Mucuri (Controle 3). Para o monitoramento nos ambientes recifais, as amostragens foram realizadas nos Recifes de Coroa Vermelha e Nova Viçosa denominado como “Cassurubá” (CA), Parcel das Paredes (PP), Arquipélago de Abrolhos (ABR) e Parcel dos Abrolho (PAB) (Figura 5, Tabela 3).

A frequência amostral nos ambientes estuarinos foi alterada durante o período de transição, passando de semestral para trimestral. Contudo, devido às paralisações decorrentes da pandemia (Covid 19) apenas uma campanha (dez/2019) foi realizada durante o período de Transição nos ambientes estuarinos. Cabe ressaltar que em dezembro/2020 houve flexibilização para o desenvolvimento de trabalho de campo e as atividades de pesquisa foram retomadas, tudo com os devidos protocolos de biossegurança, assim entre dezembro/2020 e setembro/2021 foram realizadas mais quatro campanhas de recrutamento no ambiente estuarino (Tabela 4). Nos ambientes recifais, a frequência amostral não foi alterada durante o período de transição. Nesses ambientes, as coletas de pós-larvas de peixes ocorreram em janeiro e fevereiro/2019, agosto e setembro/2019, março/2020 e janeiro/2021 (Tabela 5). A duração de cada campanha foi variável devido a problemas de

navegação (mecânico ou climáticos). Todavia, isso não comprometeu o número de amostras (esforço amostral), que foi o mesmo (duas noites) em todas as zonas e campanhas de amostragem.



Figura 5: Mapa destacando as zonas de monitoramento dos ambientes recifais (1 a 4) e estuarinos (5 a 8). 1= Arquipélago de Abrolhos (ABR), 2= Parcel dos Abrolho (PAB), 3= Cassurubá (CA), 4= Parcel das Paredes (PP), 5= foz do Rio Mucuri (MUC), 6= foz do Rio São Mateus (SM), 7= foz do Rio Doce (Doce) e 8= foz do Rio Piraquê-Açu (PQ)

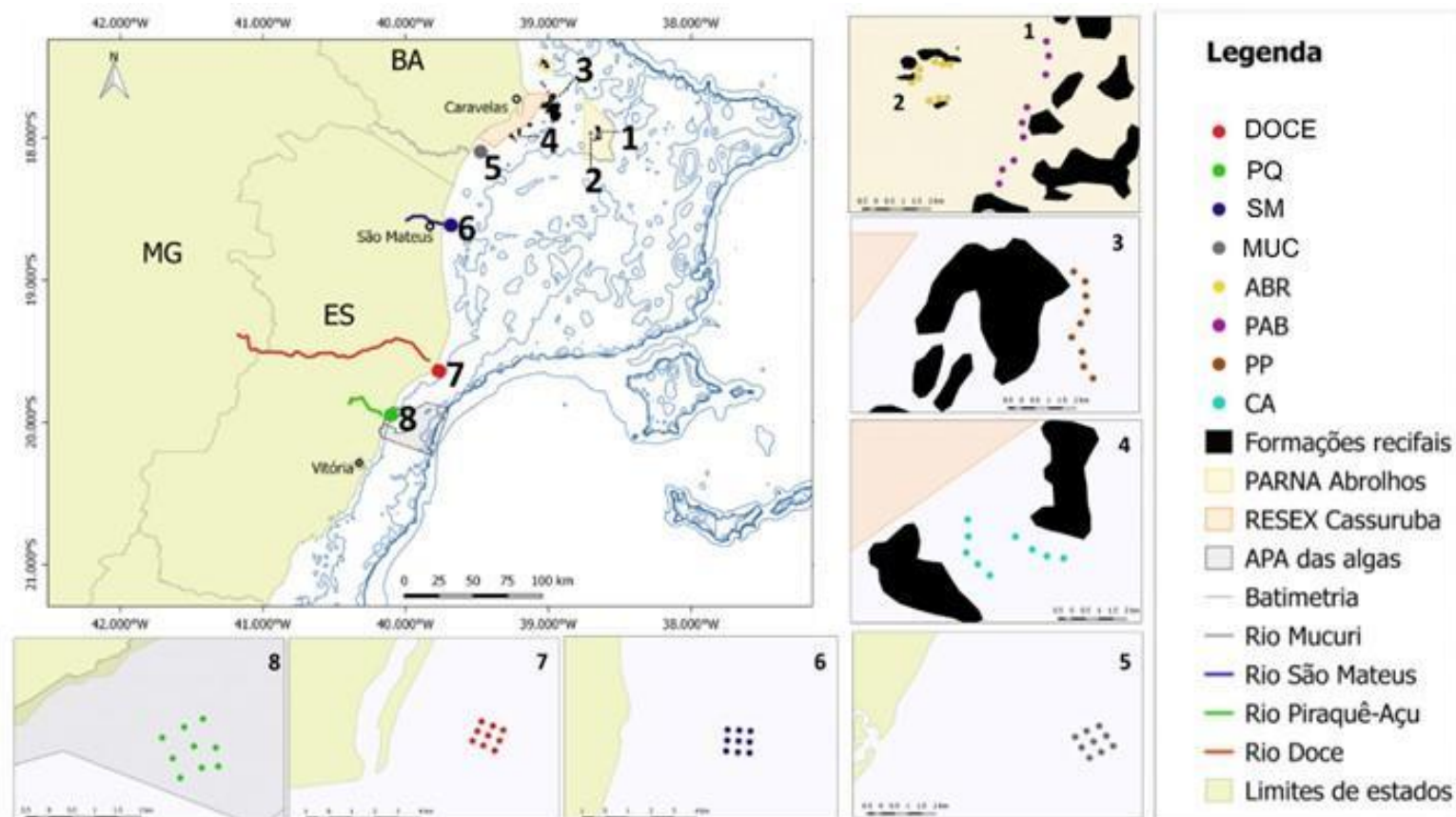


Tabela 3: Pontos de coletas pré-estabelecidos para o monitoramento do recrutamento da ictiofauna nas zonas dos ambientes estuarinos e recifais. Coordenadas em UTM/SIRGAS2000

Ambiente	Zona	Código	Leste	Norte
Estuarino	Rio Doce	LTI-1	418951.00	7828145.00
		LTI-2	419159.00	7828602.00
		LTI-3	419390.00	7829045.00
		LTI-4	419420.00	7827938.00
		LTI-5	419632.00	7828396.00
		LTI-6	419833.00	7828849.00
		LTI-7	419921.00	7827704.00
		LTI-8	420127.00	7828164.00
		LTI-9	420289.00	7828652.00
	Rio Piraquê-Açú	LTC1-1	384185.00	7794216.00
		LTC1-2	384417.00	7793738.00
		LTC1-3	384583.00	7793288.00
		LTC1-4	384662.00	7794461.00
		LTC1-5	384877.00	7794020.00
		LTC1-6	385049.00	7793527.00
		LTC1-7	385071.00	7794652.00
		LTC1-8	385352.00	7793992.00
		LTC1-9	385408.00	7793560.00
	Rio São Mateus	LTC2-1	427561.73	7942247.08
		LTC2-2	428067.19	7942226.16
		LTC2-3	428558.36	7942194.62
		LTC2-4	427548.03	7941765.64
		LTC2-5	428042.79	7941737.85
		LTC2-6	428519.72	7941699.46
		LTC2-7	427502.41	7941277.61
		LTC2-8	428010.93	7941221.51
		LTC2-9	428516.35	7941197.08
	Rio Mucuri	LTC3-1	449049.44	7999257.60
		LTC3-2	449471.83	7999497.69
		LTC3-3	449935.89	7999704.06
		LTC3-4	449291.61	7998832.68
		LTC3-5	449731.85	7999070.76
		LTC3-6	450197.35	7999298.59
		LTC3-7	449580.42	7998411.42
		LTC3-8	450010.24	7998643.89
		LTC3-9	450454.95	7998892.60
Recifal	Arquipélago de Abrolhos	LTC1-1	530704	8012777
		LTC1-2	531022	8012998



		LTC1-3	531241	8013291
		LTC1-4	531339	8012223
		LTC1-5	531762	8012222
		LTC1-6	532080	8012222
		LTC1-7	531648	8013531
		LTC1-8	532061	8013462
		LTC1-9	532539	8013461
	Parcel dos Abrolhos	LTC2-1	535610	8014900
		LTC2-2	535455	8015243
		LTC2-3	535368	8015457
		LTC2-4	535220	8015589
		LTC2-5	535435	8014586
		LTC2-6	535443	8014474
		LTC2-7	535312	8014346
		LTC2-8	535230	8014230
		LTC2-9	535164	8014125
	Cassurubá	LTC3-1	474771	8012988
		LTC3-2	474794	8012352
		LTC3-3	474723	8011755
		LTC3-4	475143	8011324
		LTC3-5	475587	8010887
		LTC3-6	476527	8012349
		LTC3-7	477138	8011870
		LTC3-8	477679	8011629
		LTC3-9	478291	8011543
	Parcel das Paredes	LTC4-1	424493	7961845
		LTC4-2	416911	7971526
		LTC4-3	440272	7972197
		LTC4-4	431619	7987228
		LTC4-5	421041	7988070
		LTC4-6	438599	7990939
		LTC4-7	429574	7992415
		LTC4-8	420978	7989155
		LTC4-9	436287	7987920

Tabela 4: Data de execução das amostragens de pós-larvas de peixes nos ambientes estuarinos durante dezembro/2018, maio/2019, dezembro/2019, dezembro/2020, fevereiro/2021, abril/2021 e julho/2021.

Local (fz)	Zona	Dez/2018	Mai/2019	Dez/2019	Dez/2020	Fev/2021	Abr/2021	Jul/2021
Rio Doce	Impacto	12/12/2018	13/05/2019	23/12/2019	13/12/2020	11/02/2021	14/04/2021	10/07/2021
Rio Doce	Impacto	13/12/2018	14/05/2019	24/12/2019	14/12/2020	12/02/2021	15/04/2021	11/07/2021
Rio Piraquê-Açú	Controle 1	10/12/2018	11/05/2019	25/12/2019	15/12/2020	13/02/2021	12/04/2021	13/07/2021
Rio Piraquê-Açú	Controle 1	11/12/2018	12/05/2019	26/12/2019	16/12/2020	14/02/2021	13/04/2021	14/07/2021
Rio São Mateus	Controle 2	04/12/2018	07/05/2019	27/12/2019	18/12/2020	09/02/2021	09/04/2021	08/07/2021
Rio São Mateus	Controle 2	05/12/2018	08/05/2019	28/12/2019	19/12/2020	10/02/2021	10/04/2021	09/07/2021
Rio Mucuri	Controle 3	01/12/2018	05/05/2019	21/12/2019	20/12/2020	07/02/2021	07/04/2021	15/07/2021
Rio Mucuri	Controle 3	02/12/2018	06/05/2019	22/12/2019	21/12/2020	08/02/2021	08/04/2021	16/07/2021

Tabela 5: Data de execução das amostragens de pós-larvas de peixes nos ambientes recifais durante janeiro e fevereiro/2019, agosto e setembro/2019, março/2020, janeiro/2021. NA= não amostrado no período

Local (recifes)	Zona	Jan-Fev/2019	Ago-Set/2019	Mar/2020	Jan/2021
Arquipélago de Abrolhos	ABR	27/01/2019	27/08/2019	08/03/2020	16/01/2021
Arquipélago de Abrolhos	ABR	28/01/2019	28/08/2019	09/03/2020	17/01/2021
Parcel dos Abrolhos	PAB	29/01/2019	29/08/2019	10/03/2020	18/01/2021
Parcel dos Abrolhos	PAB	30/01/2019	30/08/2019	11/03/2020	19/01/2021
Cassurubá	CA	08/02/2019	09/09/2019	NA	07/01/2021
Cassurubá	CA	09/02/2019	10/09/2019	NA	08/01/2021
Parcel das Paredes	PP	13/02/2019	02/09/2019	15/03/2020	09/01/2021
Parcel das Paredes	PP	14/02/2019	03/09/2019	16/03/2020	10/01/2021

Para a captura das pós-larvas de peixes, foram utilizadas armadilhas luminosas do tipo CARE® (ECOCEAN, Figura 6). Essas armadilhas são compostas de três partes: sistema flutuante / impermeável (que permite que a armadilha fique na superfície da água), parte de iluminação (18 horas de duração da luz, bateria recarregável de chumbo selada 12V/12, Temporizador de 12V), e a parte de coleta das pós-larvas (rede cônica de malha 2 x 2 mm, coletor de PVC fixado na extremidade da rede) (Figura 6, Figura 7). Nove armadilhas foram instaladas em pontos pré-estabelecidos dentro de cada local de amostragem (Figura 7). A instalação das unidades ocorreu antes do pôr do sol e a recuperação no amanhecer, durante duas noites consecutivas, totalizando 18 amostras em cada local por campanha. As armadilhas foram instaladas na superfície em posição vertical com auxílio de uma âncora, ligadas por cabos e correntes a uma boia de sinalização (LECAILLON, 2004) e com uma distância de aproximadamente 300 m entre armadilhas (FÉLIX-HACKRADT et al., 2013; CATALÁN et al., 2014).

Figura 6: Representação dos componentes de uma armadilha luminosa tipo CARE® (ECOCEAN) indicando, (A) sistema flutuante/impermeável, (B) parte de iluminação e (C) rede cônica

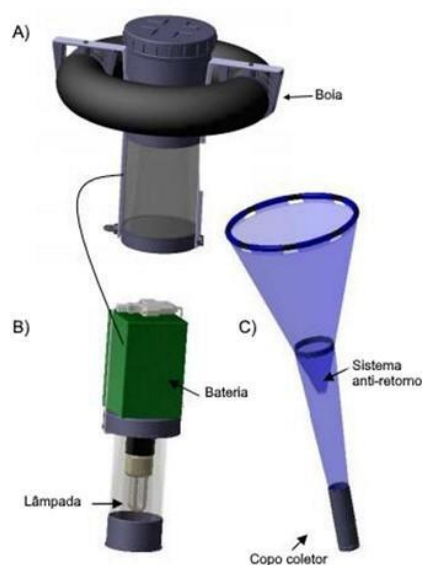


Figura 7: Armadilhas luminosas do tipo CARE® (ECOCEAN) em funcionamento



Após 12 horas de imersão, as armadilhas foram retiradas e as amostras coletadas foram transferidas para potes (devidamente etiquetados com informações sobre a data, hora e local da coleta) contendo álcool 70% para a sua preservação (FÉLIX-HACKRADT et al., 2013). Após a coleta, as amostras foram levadas até o laboratório de Ecologia e Conservação Marinha da UFSB, Porto Seguro-BA. Neste, as larvas foram triadas, mensuradas, pesadas e identificadas segundo bibliografia atualizada (RICHARDS, 2006; BONECKER et al., 2006, BONECKER et al., 2014).

Concomitante às coletas de recrutamento larval, variáveis físico-químicas (temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido e turbidez) foram mensuradas utilizando uma sonda multiparâmetros Horiba. A profundidade do local de instalação das armadilhas foi obtida com sonar da embarcação e as variáveis meteoceanográficas (altura de ondas, direção e intensidade do vento, direção e intensidade da corrente, % iluminada da lua etc.) foram obtidas através de visualização direta (Figura 8) ou extraídos no portal do Centro de Previsão de tempo e Estudos Climáticos (CPTEC: [www.cptec.inpe.br](http://www.cptec.inpe.br)) e Surf guru ([www.surfguru.com.br](http://www.surfguru.com.br)). Devido a um possível problema de calibração do sensor de turbidez da sonda multiparâmetro nas duas últimas campanhas realizadas nos ambientes estuarinos, o coeficiente de atenuação difusa (KD490 nm) foi acessado via sensoriamento remoto e utilizado como proxy da turbidez. Para isso, os dados do sensor MODIS-Aqua (*Level-3, 8-day period*) disponibilizado pelo portal Ocean color da NASA (<https://oceancolor.gsfc.nasa.gov/l3/order/>) foram processados no software SeaDAS (Seadas-7.5.3).

Figura 8: Registro fotográfico das amostragens. A) Armadilha luminosa sendo recolhida após 12 h de imersão. B) Representação das amostras coletadas. C e D) Mensuração e registro dos dados físico-químicos e meteoceanográficos



## 4.2 ANÁLISES DE DADOS

O delineamento amostral e analítico para as avaliações de impacto adotou o método *beyond-BACI* (UNDERWOOD, 1991, 1992, 1993, 1994). Para o método escolhido, a foz do Rio Doce (denominada “Zona Impacto”) teve sua variância comparada com áreas adjacentes semelhantes em estrutura e distantes da área de interesse (denominada “Controle”). Seguindo o desenho amostral e analítico adotado, as diferenças foram avaliadas através do contraste da variância da zona Impacto vs a somatória das variâncias das zonas Controle (ANDERSON et al., 2008).

Para o comparativo, foram performadas análises de variância por permutação (PERMANOVA), de maneira multivariada, para a estrutura da assembleia de peixes (composição e abundância de espécies), e de forma univariada para a abundância total, biomassa total, comprimento total (CT) médio, riqueza de espécies (S), diversidade de Shannon-Wiener (H'), equitatividade de Pielou (J), e diversidade alfa (0D, 1D e 2D). Todas as métricas univariadas foram calculadas por amostra, ou seja, por unidade de esforço (CPUE). Para as análises de variância, os valores de abundância e biomassa foram transformados por  $\text{Log}(x+1)$ . As análises univariadas e multivariadas foram baseadas na matriz de similaridade de Bray-Curtis. Para ambos os modelos, a soma dos quadrados foi do tipo I (sequencial), no qual os efeitos fixos somam zero para termos mistos. *P* valores foram obtidos usando 9999 permutações. Os fatores incluídos nos modelos foram: Tempo (3 níveis, aleatório) e Zona (Fixo, ortogonal com o Tempo, com 4 níveis). Para o ambiente estuarino foi adicionada uma análise de contraste (Impacto vs Controles) aos modelos delineados, onde a variância da zona Impacto foi comparada com a somatória das variâncias das zonas Controle. Considerando o objetivo dos indicadores, as interpretações das análises de variância foram baseadas, majoritariamente, no contraste Impacto vs Controles (ANDERSON et al., 2008). As análises de variância por permutação foram feitas no software Primer (versão 6.1.13).

Para visualizar as diferenças na composição e abundância de espécies (*taxa*) de pós-larvas de peixes entre as zonas de monitoramento, foi utilizado o Diagrama de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), com base na matriz de similaridade de Bray-Curtis com os dados de abundância transformados por  $\text{Log}(x+1)$ . Adicionalmente, os dados ambientais e as espécies (*taxa*) foram correlacionados às dimensões da ordenação. Os vetores das variáveis contínuas foram ajustados à ordenação, com o comprimento da seta proporcional à correlação obtida. Nos gráficos foram apresentadas apenas as variáveis que exibiram correlação significativa ( $P < 0,01$ ). Para as ordenações e análises de correlação (envfit) o pacote vegan (OKSANEN et al., 2019) foi utilizado no ambiente R (versão 4.0.1; R Core Team, 2020).

Para avaliar a eficiência do esforço amostral realizado em representar a riqueza de espécies para cada zona de monitoramento, curvas de rarefação foram desenvolvidas utilizando dados de incidência baseados em unidades de amostragem. Intervalos de confiança (*bootstrap*) em torno da riqueza para amostras rarefeitas/extrapoladas foram plotados para facilitar as comparações entre as zonas de monitoramento. A rarefação e extrapolação da riqueza de espécies com base no tamanho da amostra foram calculadas utilizando o pacote iNext (CHAO & JOST, 2012) no ambiente R (versão 4.0.1; R Core Team, 2020).

Buscando aprofundar o efeito do impacto sobre a diversidade das comunidades nos estágios de pós-larvas, aplicamos um índice de diversidade verdadeira (*sensu* JONES, 2006, 2007), considerando que o número efetivo de espécies é equivalente ao número de Hill ( $qD$ ) (HILL, 1973) onde, a diversidade poder ser quantificada como espécies igualmente abundantes, com base no aumento do peso da abundância pela ordem de diversidade  $q$ . Quando  $q$  igual a 0 ( $0D$ ) as abundâncias são desconsideradas, o que favorece a representatividade de espécies raras; quando  $q$  é igual a 1 ( $1D$ ) o valor de diversidade gerado equivale a entropia de Shannon e espécies comuns na comunidade têm representação mais efetiva; e quando  $q$  é igual a 2 ( $2D$ ) um peso desproporcional é dado para abundância e as espécies dominantes são mais representativas (JOST, 2007). Os índices de diversidade foram calculados utilizando o pacote Entropart (HÉRAULT, 2015) no ambiente R (versão 4.0.1; R Core Team, 2020).

## 5 ECOLOGIA TRÓFICA – ISÓTOPOS ESTÁVEIS

### 5.1 COLETA DE DADOS E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

As análises de isótopos estáveis tiveram por objetivo: i) estimar a posição trófica dos organismos pertencentes à comunidade demersal do estuário do Rio Doce e ii) avaliar a evolução das métricas de diversidade trófica ao longo dos anos. Para o primeiro objetivo foi utilizada a base de dados isotópicos oriunda da estação chuvosa (fevereiro/março) do Ano 1, a qual compreende assinaturas de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  dos principais consumidores do estuário do Rio Doce. Macro-consumidores (peixes) foram coletados principalmente por meio de arrasto de fundo tracionado, enquanto os caranguejos foram coletados via captura manual e os micro-consumidores (zooplâncton) utilizando redes de



zooplâncton. Amostras de tecido muscular dos consumidores foram extraídas e destinadas a secagem em estufa a 60°C. Organismos diminutos (ex: zooplâncton) foram preparados inteiros e posteriormente sub-amostras foram acidificadas com HCl para remoção de carbonatos. Todas as amostras foram posteriormente maceradas com auxílio de gral e pistilo, encapsuladas em cápsulas de estanho e enviadas para a análise.

As análises isotópicas de  $^{13}\text{C}$  e  $^{15}\text{N}$  foram conduzidas usando um analisador elementar (Flash 2000, Thermo Scientific) acoplado em um espectrômetro de massa de razão isotópica (Delta V Plus, Thermo Scientific, Bremen – Germany). Os resultados obtidos foram expressos em notação  $\delta$  (‰) a partir dos valores de referência em acordo a equação  $\delta X = [(Ramostra/Rreferência)-1] \times 103$ . Onde X é  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$ , e R é a razão correspondente a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . A precisão analítica para  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  foi de  $< 0,15$  ‰ segundo USGS-24, IAEA-CH6, IAEA-600 para  $\delta^{13}\text{C}$  e IAEA-N2, IAEA-NO-3, IAEA-600 para  $\delta^{15}\text{N}$ .

Para o segundo objetivo foram selecionadas seis espécies de peixes coletadas no estuário do Rio Doce, nos períodos anterior (novembro de 2015) e posteriores (junho de 2016, novembro de 2019 e junho de 2020) à chegada e passagem da lama de rejeitos no estuário em Regência, ES. As coletas de 2015 e 2016 foram realizadas previamente ao acordo de cooperação que originou o PMBA/RRDM e constituem dados do Laboratório de Ictiologia-UFES. As espécies estudadas foram o amoré-flecheiro (*Ctenogobius boleosoma*), amoré-preto (*Eleotris pisonis*), carapicu (*Eucinostomus argenteus*), amoré-lira (*Evorthodus lyricus*), bagre-guri (*Genidens genidens*) e o peixe-cachimbo (*Microphis lineatus*). Estas espécies pertencem a cinco famílias (Gobiidae, Eleotridae, Gerreidae, Ariidae e Syngnathidae). O processamento e análise de isótopos estáveis das seis espécies seguiu o mesmo padrão que para os macro-consumidores do objetivo anterior. No entanto, como na primeira amostragem (2015-pré-impacto) os peixes foram fixados em solução formalina 10% e posteriormente preservados em álcool 70%, as demais amostragens seguiram o mesmo protocolo para evitar viés do método de preservação. Além disso, o tamanho e peso dos indivíduos foram similares nos períodos selecionados (2015, 2016, 2019 e 2020) evitando um viés ontogenético e, consequentemente, permitindo a comparação dos dados entre indivíduos das mesmas espécies nos diferentes períodos amostrais.

## 5.2 ANÁLISES DE DADOS

A posição trófica dos consumidores do estuário do Rio Doce foi estimada usando o pacote 'trophicPosition' no software R. O organismo baseline utilizado para o modelo foi o caranguejo chama-maré *Minuca rapax*, pois estes são reconhecidamente depositívoros, ou seja, consumidores basais. As métricas de diversidade trófica foram estimadas por meio de inferência Bayesiana no pacote 'siber' do software R, sendo elas: amplitude de  $\delta^{13}\text{C}$ , amplitude de  $\delta^{15}\text{N}$  e nicho isotópico. A amplitude de  $\delta^{13}\text{C}$  indica a distância entre os dois indivíduos com assinaturas de  $\delta^{13}\text{C}$  mais enriquecidas e empobrecidas, o que fornece uma ideia da amplitude do uso de recursos basais pelas

espécies estudadas e a diversificação do nicho na base da teia trófica em questão, enquanto a amplitude de  $\delta^{15}\text{N}$  indica a distância entre os dois indivíduos com assinaturas de  $\delta^{15}\text{N}$  mais enriquecidas e empobrecidas de cada espécie em cada período, fornecendo uma representação da estrutura vertical da diversidade trófica das espécies, ou seja, em quais níveis tróficos as espécies atuam como consumidoras. O nicho isotópico corresponde a área ocupada no  $\delta$ -espaço bidimensional pelas assinaturas de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  e é análogo ao nicho trófico Eltoniano, visto que as assinaturas de  $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$  são indicadoras da origem dos recursos consumidos e da posição trófica ocupada pelos consumidores, portanto o nicho isotópico é um robusto indicador da largura do nicho trófico de uma espécie. Dessa forma, a evolução das métricas ao longo dos anos para estas seis espécies estuarinas do Rio Doce podem ajudar na compreensão das perturbações ecológicas causadas pelo rompimento da barragem de Mariana.

## 6 CONDIÇÃO CORPORAL DE PEIXES ESTUARINOS/ MARINHOS

### 6.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A análise da condição corporal foi baseada em indivíduos capturados na região diretamente impactada (Rio Doce) e em quatro regiões de referência ou controles (rios Caravelas, São Mateus, Ipiranga e Piraquê-Açú), entre outubro de 2018 e setembro de 2019. Os controles foram separados em função da distância da área impactada, a fim de quantificar a variação na condição corporal em duas escalas espaciais: controles próximos (Ipiranga e Piraquê-Açú), localizados a menos de 60 km da região impactada e controles distantes (Caravelas e São Mateus), situados a mais de 120 km ao norte da região impactada. A falta de diferença significativa entre a região impactada e os controles próximos pode indicar que não houve impacto, ou que a extensão do impacto abrangeu esses controles, criando uma grande área impactada. A inclusão dos controles distantes permitiu avaliar essas duas alternativas.

### 6.2 ÍNDICE DE CONDIÇÃO CORPORAL

Oito espécies de peixes costeiros foram selecionadas para a análise da condição corporal, tendo em vista que elas foram consistentemente capturadas tanto na área impactada quanto nos controles, em diferentes estações do ano: *Chirocentrodon bleekermanus* (sardinha-dentuça), *Odontognathus mucronatus* (sardinha), *Pellona harroweri* (sardinha-olhuda), *Isopisthus parvipinnis* (pescadinha), *Paralonchurus brasiliensis* (maria-luís), *Stellifer brasiliensis* (cangoá), *Stellifer rastrifer* (cangoá) e *Symphurus tessellatus* (língua-de-mulata).

A condição corporal das espécies selecionadas foi analisada usando o índice de massa escalonado (PEIG & GREEN, 2009), calculado como:

$$\text{Índice de Massa Escalonado (IMS)} = \left[ \frac{CT_0}{CT_i} \right]^{b_{EPR}}$$



No qual  $m_i$  e  $CT_i$  são a massa (em g) e o comprimento total (em mm) de cada espécime, respectivamente,  $CT_0$  é o comprimento total médio de cada espécie e  $bEPR$  é a inclinação da reta de uma regressão linear entre o logaritmo da massa e o logaritmo do comprimento total, calculada com o método do eixo principal reduzido. Este índice apresenta notável vantagem em comparação a outros métodos, como o coeficiente de condição relativo e o coeficiente de condição de Fulton, que geralmente são influenciados pelo tamanho dos indivíduos e, no caso do coeficiente de Fulton, assume uma relação isométrica entre o peso e o comprimento (ou seja,  $b = 3$ ) que frequentemente não ocorre (PEIG & GREEN, 2010).

Para obter os valores de  $bEPR$ , foram realizados três passos. Primeiro, prováveis erros (de identificação, medição ou de anotação, por exemplo) foram identificados com base nos resíduos de uma regressão linear entre o logaritmo da massa e o logaritmo do comprimento total de cada indivíduo das espécies selecionadas. Todos os indivíduos com resíduos  $> 1,5$  desvio padrão de cada lado da linha da regressão, calculada individualmente para cada espécie, foram descartados. Posteriormente, os resíduos foram novamente calculados sem os prováveis erros e os valores discrepantes (outliers, i.e., resíduos acima do terceiro quartil ou abaixo do primeiro quartil, mais de 1,5 vezes a distância interquartilica) foram então identificados e descartados, para melhorar o ajuste dos modelos. Por fim, a relação entre os dados de massa e comprimento total transformados foi modelada sem os outliers e o parâmetro  $b$  foi usado para calcular o IMS para cada indivíduo de cada espécie, após reintegrar os outliers à base de dados. Para aumentar o número de indivíduos de cada espécie e, em consequência, obter estimativas mais confiáveis de  $bEPR$ , as regressões foram realizadas considerando tanto as capturas realizadas nas áreas internas quanto nas áreas externas aos estuários amostrados.

Visto que a relação entre a massa e o comprimento dos peixes pode mudar durante o desenvolvimento (FROESE, 2006), o teste de Davies foi usado para identificar se houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) no valor de  $b$  ao longo do crescimento de cada espécie (DAVIES, 2002). Quando foram identificadas diferenças, uma regressão linear segmentada foi utilizada para estimar a localização do ponto de inflexão e os parâmetros da regressão antes e depois deste ponto (MUGGEO, 2003). Esses parâmetros foram então utilizados para identificar os prováveis erros, outliers e para o cálculo do IMS para cada indivíduo nos diferentes segmentos da reta, como descrito acima.

### 6.3 ANÁLISES DE DADOS

Para evitar eventuais efeitos da variabilidade ambiental natural nas comparações da condição corporal (ver BROSSET et al., 2015; LATOUR et al., 2017; SALVADOR & MUELBERT, 2019), somente indivíduos capturados na área marinha adjacente aos rios Caravelas, São Mateus, Ipiranga, Doce e Piraquê-Açú, foram analisados quanto ao IMS. Estudos anteriores mostraram que essas áreas apresentam características ambientais mais semelhantes do que os estuários (RRDM, 2020). Considerando que as condições ambientais e a concentração de poluentes associados ao rejeito

variam sazonalmente na região do rio doce (RRDM, 2020), os indivíduos foram separados em quatro estações hidrológicas: início (outubro a dezembro 2018) e final (janeiro a março 2019) da estação chuvosa e início (maio a junho 2019) e final (julho a setembro 2019) da estação seca. Porém, somente as estações com número suficiente de espécimes mensurados em cada uma das cinco áreas amostradas, foram incluídas nas análises.

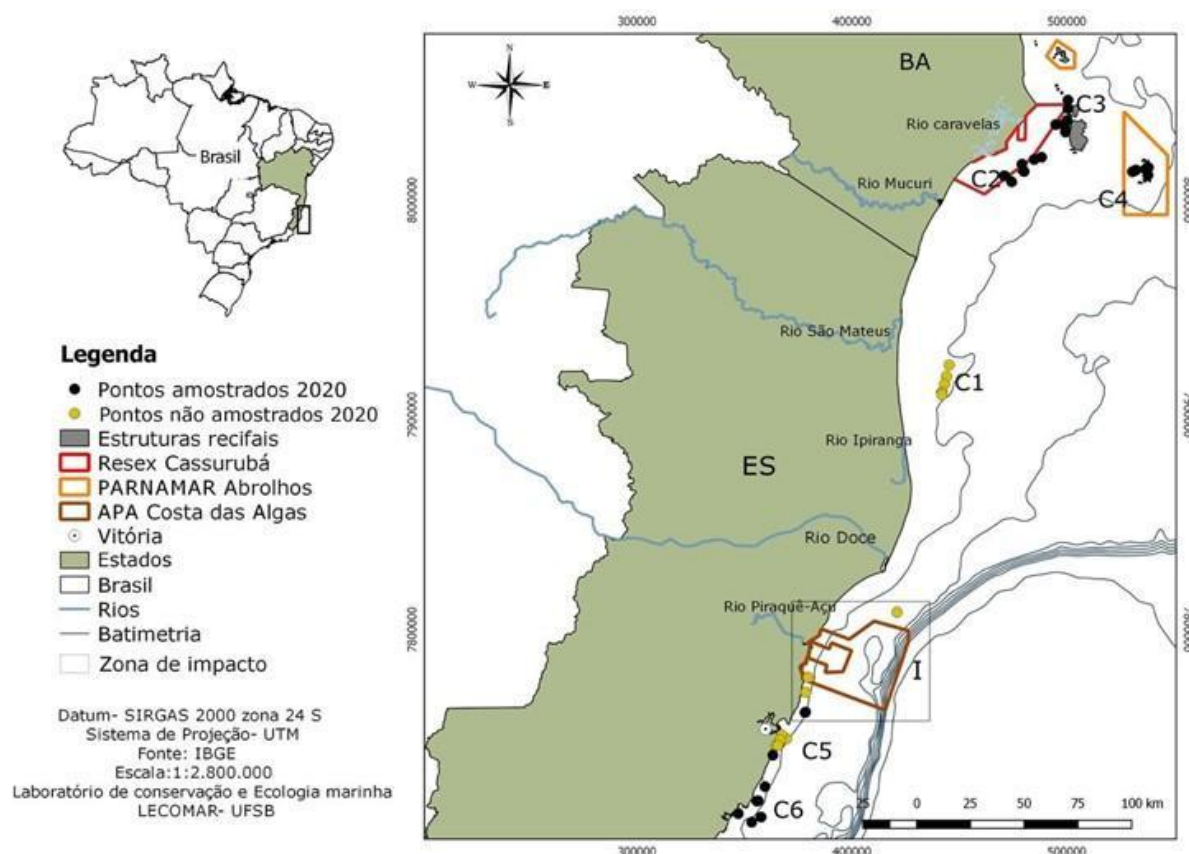
Para testar a hipótese que a condição corporal dos peixes no rio doce é diferente dos locais de referência, foram utilizadas análises de variância assimétricas (PERMANOVA's; ANDERSON et al., 2008) baseadas em matrizes de distância euclidiana calculadas a partir do IMS (variável dependente). As análises incluíram quatro fatores: estações (fixo, com até quatro níveis: início e final da estação chuvosa e início e final da estação seca), locais (fixo, com dois níveis: impacto e controles próximos ou controles distantes), áreas (aleatório, com três níveis aninhados em locais: Rio Doce, Ipiranga e Piraquê-Açú, ou Rio Doce, São Mateus e Caravelas) e pontos (aleatório, com quatro níveis aninhados em áreas). As PERMANOVA's foram realizadas separadamente para controles próximos (Piraquê-Açú e Ipiranga) e controles distantes (São Mateus e Caravelas). O IMS foi transformado em logaritmo natural para reduzir a heterogeneidade das variâncias, que foi avaliada usando o teste de Levene. Os valores de "p" foram determinados usando 4999 permutações dos resíduos sob um modelo reduzido. Quando o número de permutações possíveis foi insuficiente para realizar o teste com um poder razoável, a significância das diferenças foi calculada usando o procedimento de Monte Carlo (ANDERSON et al., 2008). Devido ao uso de permutações para obter os valores de p, a PERMANOVA não pressupõe que os dados apresentem uma distribuição normal. Quando foram identificadas interações significativas entre os fatores estações vs. Locais, os últimos foram comparados dentro de cada estação, para investigar se o padrão espacial do IMS mudou em função da sazonalidade (ANDERSON et al., 2008).

## 7 ICTIOFAUNA RECIFAL

### 7.1 ÁREA DE ESTUDO

A fim de descrever a estrutura das comunidades de peixes recifais foram estabelecidas seis áreas de controle e uma de impacto: Recife dos Esquecidos (C1), Cassurubá (C2), Paredes (C3), PARNA Abrolhos (C4), Vitória (C5), Guarapari (C6) e APA Costa das Algas (I), respectivamente (Figura 9).

Figura 9: Mapa referente aos pontos de amostragem dos dados coletados na metodologia do censo visual e em fotoquadrado das três campanhas nos períodos de 2019 e 2020. São seis zonas de controle e uma zona de impacto C1 = Recife dos Esquecidos, C2 = Cassurubá, C3 = Paredes, C4 = PARNA Abrolhos, C5 = Vitória, C6 = Guarapari e I = APA Costa das Algas



## 7.2 COLETA DE DADOS

### 7.2.1 Variáveis ambientais e cobertura bentônica

Em cada ponto fixo realizado para censos visuais (censo ou unidade amostral), os dados ambientais (ver Protocolo para Coleta de Dados com Censo Visual Subaquático e Fotoquadrado) foram tomados para controle da variabilidade espacial entre setores e localidades amostradas. São registradas para cada censo a profundidade e a visibilidade horizontal. Ao finalizar o censo, o mergulhador estima em cada quadrante do cilindro as variáveis de heterogeneidade do habitat (tipo de substrato) e complexidade (arquitetura e verticalidade do substrato).

Para obtenção de dados de cobertura bentônica (% de organismos que recobriam o fundo), foi utilizada a metodologia de fotoquadrado anexada ao censo visual de peixes. Foram utilizados 2 quadrados feitos de tubo de PVC com as dimensões 80x70 cm. Os quadrados são subdivididos em 15 fotos de 22x15 cm, em que cada subdivisão serviu como referência para as fotografias de fundo (FRANCINI-FILHO, 2008). As imagens foram analisadas no software CPCe (*Coral Point Count with Excel extensions* 4.1) utilizando 30 pontos aleatórios por foto. Após a análise das fotos no CPCe, os dados de porcentagem de cobertura por grupo bentônico foram exportados para uma matriz de Excel.

O conjunto de 15 fotos compuseram um fotoquadrado, e a média de cobertura obtida pelos dois fotoquadrados de cada ponto fixo do censo representaram uma unidade amostral.

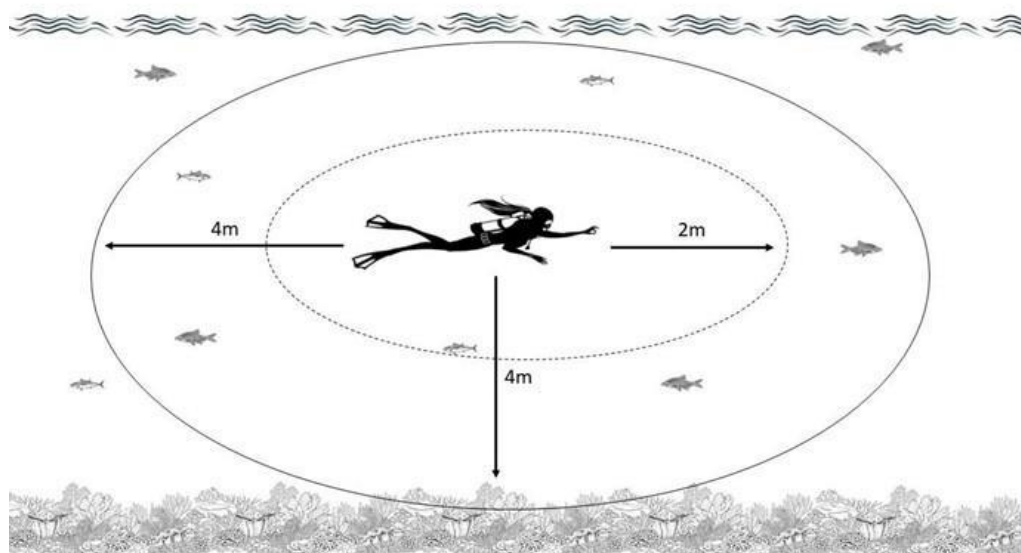
Os organismos bentônicos foram classificados nos seguintes grupos: 1) Macroalgas; 2) Sedimento; 3) Filtradores; 4) Outros invertebrados; 5) Equinodermos; 6) Matriz de algas epilíticas (MAE); 7) Cianobactérias; 8) Alga calcária; 9) Octocorais; 10) Zoantídeo 11) Corais incrustante; 12) Corais massivos e 13) Corais ramificados.

### 7.2.2 Peixes recifais

Seguindo o desenho de impacto *beyond BACI* proposto por UNDERWOOD (1992), onde não há dados prévios ao impacto resultando em uma comparação ACI, estabelecemos múltiplos controles (n=6) a serem contrastados com a zona impacto (n=1). Em cada uma das sete zonas de estudo (C1=Recifes Esquecidos, C2= Cassurubá, C3=Paredes, C4=Abrolhos, C5=Vitória, C6=Guarapari e I=APA Costa das Algas) foram selecionados seis setores aleatórios. As zonas amostrais C5 e C6 foram inseridas no período de transição no intuito de ampliar as zonas Controle ao sul do Rio Doce, e ampliar a variabilidade de ambientes avaliada. Em cada setor são realizados seis pontos fixos, sendo que cada um possui um raio de quatro metros, para peixes >20cm, e um raio de dois metros para peixes <20cm, adaptado de MINTE-VERA et al. (2008). Para realizar um censo uma trena é estendida sobre o fundo para auxiliar na delimitação do raio amostral que determina o volume do cilindro imaginário onde é realizada a identificação das espécies de peixes por um tempo total de cinco minutos (Figura 10). Em seguida são anotadas as abundâncias das espécies identificadas. O tamanho dos peixes é estimado em classes de dois em dois centímetros. Estas medidas diminuem o erro amostral e, portanto, aumentam a acurácia dos dados coletados (Ver Protocolo para Coleta de Dados com Censo Visual Subaquático e Fotoquadrado para mais detalhes).

Para a realização dos 36 pontos fixos em cada zona necessita-se de aproximadamente três a cinco dias embarcados (correspondente a uma campanha), a depender da quantidade de mergulhadores e das condições de navegação.

Figura 10: A metodologia de censo visual da comunidade de peixe recifal. Um mergulhador se posiciona no meio de um cilindro de quatro m de raio, marcado com uma trena, e anota todos os peixes que passam dentro do cilindro durante cinco minutos. Indivíduos menores do que 20 cm são observados com um raio de dois metros para evitar subestimação devido visibilidade limitada



## 7.3 ANÁLISES DE DADOS

### 7.3.1 Variáveis ambientais

As matrizes de dados foram organizadas segundo Tempo (Campanha 1-3), Zona (sete níveis), Setor (seis níveis) e Amostra (seis amostras). Campanha 1 (T1) foi realizada entre janeiro – março 2019, campanha 2 (T2) durante junho – agosto 2019 e campanha 3 (T3) durante janeiro – março 2020.

As variáveis ambientais foram avaliadas quanto à existência de autocorrelação através do software R, com o pacote estatístico '*Performance Analytics*', e suprimidas das análises posteriores quando correlacionadas (apresentando valores maiores do que 0.70). Com as variáveis restantes foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com a finalidade de avaliar o grau de similaridade entre as amostras obtidas em função das variáveis ambientais através do pacote '*vegan*' (OKSANEN et al., 2019). Adicionalmente gráficos box-plots foram utilizados para ilustrar a flutuação dos parâmetros ambientais coletados em função do espaço e/ou tempo amostrado.

### 7.3.2 Assembleias de peixes recifais

A biomassa dos indivíduos de peixes foi calculada causando as constantes  $a$  e  $b$ , obtidas no FishBase (FROESE & PAULY, 2019). Para caracterizar as comunidades de peixe em cada zona em termos de grupos tróficos, cada espécie foi classificada dentro de um dos seguintes grupos tróficos: Piscívoro-cefalopoda (PC), Herbívoro-detritívoro (HD), Herbívoro móvel (HM), Invertebrados sésseis

(IS), Invertebrados móveis (IM), Onívoro (ONI) ou Planctívoro (PL) seguindo também a classificação do FishBase (FROESE & PAULY, 2019).

Para comparar a composição, abundância, riqueza, diversidade de Shannon-Wiener, biomassa, tamanho médio das espécies e índices de diversidade  $\alpha$  de peixes recifais entre os fatores Zona e Setor, foi utilizado Análise de Variância por Permutação (PERMANOVA) de forma multivariada (composição de espécies) e univariada (demais variáveis), através do índice de similaridade de Bray-Curtis. Segundo o desenho amostral, foi realizado o contraste (I vs C), onde a variância da Zona Impacto foi comparada com a variância obtida entre todas as Zonas Controles. Para avaliar quais médias eram significantes entre si, o teste *pair-wise* foi utilizado quando os resultados da PERMANOVA eram significativos. Gráficos box-plots foram utilizados para visualizar as médias significativamente diferentes (incluindo o erro padrão como medida de dispersão). As variáveis ambientais obtidas em cada réplica: cobertura de organismos bentônicos, % de substrato (cascalho e recife), temperatura, rugosidade e inclinação do fundo e profundidade foram incluídas como co-variáveis dos dados de abundância, composição e biomassa de peixes nos testes estatísticos realizados (PERMANOVA).

Devido às diferenças de malha amostral entre os anos de 2019 e 2020, e que devido a pandemia as amostragens de 2020 estão incompletas, o fator “Tempo” não foi incluído como um fator fixo e a zona C5 foi excluída das análises.

Adicionalmente às diferenças em abundância e biomassa dos grupos tróficos entre as zonas e setores amostrados foram testados com PERMANOVA. As análises de PERMANOVA foram realizadas utilizando o software Primer v.6.1.15 com a extensão da PERMANOVA v.1.0.5, utilizando 9999 permutações e o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

Para visualizar a similaridade de composição e abundância da ictiofauna entre as amostras obtidas em um espaço bidimensional, foi utilizado o Diagrama de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS), também utilizando índice de similaridade de Bray-Curtis através do software R (versão 4.0.0) através do pacote ‘vegan’ (OKSANEN et al., 2019). Os dados foram standardizados com o ‘vegdist’.

Com o fim de avaliar a eficiência das amostragens realizadas em cada estudo realizado, a riqueza observada nos dados de censos visuais de cada zona foi comparada com estimadores CHAO 1 E 2, JACKKNIFE 1 e 2 e *Bootstrap* usando o software Primer v.6.1.15. Adicionalmente, foram plotados os índices de diversidade local ( $\alpha$ ), regional ( $\gamma$ ) e entre habitats ( $\beta$ ) com a finalidade de comparar a riqueza de espécies de peixes recifais entre as zonas estudadas.

Buscando aprofundar o efeito do impacto sobre a diversidade das comunidades, aplicamos um índice de diversidade verdadeira (sensu JONES, 2006, 2007) considerando que o número efetivo de espécies é equivalente ao número de Hill ( $qD$ ) (HILL, 1973) onde, a diversidade poder ser quantificada como espécies igualmente abundantes, com base no aumento do peso da abundância pela ordem de diversidade  $q$ . Quando  $q$  igual a 0 (0D) as abundâncias são desconsideradas, o que



favorece a representatividade de espécies raras; quando  $q$  é igual a 1(1D) o valor de diversidade gerado equivale a entropia de Shannon e espécies comuns na comunidade têm representação mais efetiva; e quando  $q$  é igual a 2 (2D) um peso desproporcional é dado para abundância e as espécies dominantes são mais representativas (JOST, 2007). Os índices foram calculados no software R (versão 4.0.0) através o pacote 'entropart' (HÉRAULT, 2015).

Para entender quais fatores ambientais influenciam a composição de espécies, uma Análise de Redundância (RDA) foi feita, usando as variáveis ambientais como preditores e a assembleia de peixes como variável resposta. A distância para o Rio Doce foi incluída como um *proxy* do fator impacto. Os dados ambientais foram estandarizados, através do pacote 'vegan', com o fim de permanecerem em uma mesma escala. Os dados de abundância da ictiofauna foram transformados usando a transformação de Hellinger para diminuir a influência dos zeros (LEGENDRE & GALLAGHER, 2001). A significância dos eixos foi testada com a função 'anova.cca', e apenas foram mantidas as variáveis significativas que não tiveram autocorrelação.

Para oito espécies foram avaliados os padrões populacionais de ocorrência e distribuição entre as zonas amostradas, sempre considerando o mesmo desenho amostral proposto (*beyond*-BACI). As espécies foram selecionadas por apresentarem alto grau de relevância ecológica e ou econômica, e por estarem listadas sob algum grau de ameaça segundo a lista da IUCN e/ou lista nacional de espécies ameaçadas.

## 8 GENÉTICA DE POPULAÇÕES E DIVERSIDADE GENÉTICA

### 8.1 AMOSTRAGEM

Foram selecionadas oito espécies de peixes estuarinos para estudos populacionais utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares. Concomitantemente as coletas da ictiofauna estuarina, realizada pela equipe do CEUNES – UFES, um número mínimo de 30 indivíduos de cada espécie foi amostrado em cada estuário visitado (ver Protocolo Genética de Populações), dos quais uma amostra de tecido de 5 cm<sup>2</sup> oriundo da nadadeira caudal ou anal foi recolhida e acondicionada em um microtubos com álcool 100% pela equipe do Laboratório de Genética e Conservação Animal do CEUNES-UFES, em São Mateus-ES e conduzida até o laboratório de Genética e Biologia Molecular da UFSB, em Porto Seguro-BA. Todas as amostras se encontram acondicionadas em freezer -80°C no referido laboratório.

A extração de DNA de todos os organismos coletados foi realizada seguindo o protocolo modificado de solução salina (BRUFORD et al., 1992.) para peixes recifais e através de kits de extração (PureLink™ *Genomic DNA Kit* - Invitrogen, ThermoFisher Scientific™) para peixes estuarinos. Após a extração, a concentração de DNA foi avaliada no equipamento *Qubit Fluorometric Quantitation* (ThermoFisher Scientific™).

A estratégia de investigação dos genomas visa obter polimorfismos que permitam a análise refinada dos processos microevolutivos. Foram utilizados dois marcadores de alto nível de polimorfismo, custo médio para desenvolvimento, alta resolução, análise automatizada e disponibilidade de aplicativos computacionais para análise estatística – “Dloop” e Microsatélites.

## 8.2 EXTRAÇÃO DE DNA, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO/GENOTIPAGEM

A amplificação parcial dos segmentos de DNA da região controladora (D-loop) com cerca de 1000 pb, foi efetuada utilizando foram utilizados iniciadores descritos como universais para peixes (Quadro 1).

Quadro 1: Iniciadores (*primers*) utilizados na otimização das reações de amplificação para a região controle do gene mitocondrial (Dloop), com as sequências correspondentes e autores

ID <i>primer</i>	Sequência	Autor
Marfish_Thr_F	5'-AGCACCGGTCTTGTAACCG-3'	Cheng et al. (2012)
Marfish_Phe_R	5'-GGGCTCATCTTAACATCTTCA-3'	Cheng et al. (2012)
SBL1	5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGKATTC -3	Santa Brígida et al. (2007)
SBH1	5'-TGTTTATCACTGCTGRRTTCCCT -3'	Santa Brígida et al. (2007)
Dloop A _F	5'-TCCACCTCTAACTCCCAAAGCTAG-3'	Lee et al. (1995)
Perc 12S 1R	5'-GCGGATACTTGCATGTGTAA -3'	Santa Brígida et al. (2007)

Para marcadores microsatélites, seis das quinze espécies utilizadas neste estudo não possuem marcadores moleculares microsatélites descritos na literatura, desta forma, 12 novos locus para cada uma das 6 espécies, foram prospectados pela empresa Allgenetics (Espanha), durante o período de transição (outubro/2019 e março/2020), e foram incorporados ao trabalho de caracterização genética, trazendo assim resultados inéditos a respeito da diversidade genética na região. Todos os loci usados nas amplificações para esse trabalho encontram-se descritos no Quadro 2 e Quadro 3.

Quadro 2: Marcadores microsatélites das espécies recifais que se encontram descritos na literatura

Espécie	Referência	Nº locos
<i>Mycteroperca venenosa</i> .	RENSHAW et al. (2011)	10 locos
<i>Lutjanus synagris</i> .	RENSHAW et al. (2007)	10 locos
<i>Epinephelus morio</i> .	SEYOUUM et al. (2016)	10 locos
<i>Mycteroperca bonaci</i>	ZATCOFF et al., 2002	5 locos
<i>Lutjanus analis</i>	SHULZITSKI et al. (2009), RENSCHAW et al. (2007)	10 locos
<i>Ocyurus chrysurus</i>	RENSHAW et al. (2007)	8 locos
<i>Cephalopholis fulva</i> .	RENSHAW et al., 2010	9 locos



Quadro 3: Marcadores microssatélites de seis espécies de peixes que se encontram descritos na literatura prospectados pelo laboratório *Allgenetics* (Espanha), durante o período de transição (outubro/2019 e março/2020)

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
<b><i>Conodon nobilis</i></b>						
1	AG Cno 465	AG	95	CACAGCCAAAGCCCTTCC	GAGAGAGTGTGCTTGGGACA	FAM
	AG Cno 064	AC	197	CGGCTTCTCTTTGGAATCAG	CGGTCAGTAAGGGATATCAG C	FAM
	AG Cno 474	AC	92	TGGACTCCTCTTTGTATTGTGC	CTCCACACCCATCGTCAGA	HEX
2	AG Cno 436	AG	126	TCTTTCTTCAGAGAGCTGGGTT	AACTCGCAGGAGGTAAAGCA	FAM
	AG Cno 353	AC	99	AGAAGTCACAGAAGGCCAGC	TGATGCAGAGCTTTACACGG	NED
3	AG Cno 110	AC	110	GACGAAATCGTGACATTCCC	CACATCTCAGTGTGTGCTGC	FAM
	AG Cno 373	AG	241	TGACATGCTTAGATGAGCCCT	CAACAGGATACGTCTGCGTC	HEX
	AG Cno 014	AC	97	AATTCTTGGCAGTTGGATGG	CGCTCATTCATCTGTCTTTGT C	NED
4	AG Cno 275	AG	123	TGGATCTCAATAGGCTTCGG	TATTTATCACATCGCCTCCC	FAM
5	AG Cno 288	AC	127	CTCTCAGAGACGCGCACA	ACCTCACACCTGTAGCACCC	FAM
6	AG Cno 252	AC	90	CTGAGGTGTCACTCTCGCTC	ACAGTCTGAGAAGTTAGTTTG GACA	FAM
	AG Cno 164	AC	92	TAGCCAATCGCACCTAGTC	CGTGCTTTATTATTCCTGTCCT G	NED
<b><i>Isopisthus parvipinnis</i></b>						
1	AG Ipa 150	AC	92	GTGCATATGAGGGTGACAT	GGGTATTTATGTGAGGTGGAA GA	FAM
	AG Ipa 001	AC	94	TTCTCCAGCTCCACCTCTCT	CAAACCTGCAGTGGTCTCCTG	HEX
	AG Ipa 134	AC	107	TGTACCGTAAGCAACATCCG	TGTCTCAAACGTGATCACACC	NED

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
2	AG Ipa 076	AC	114	GAAGTCAGCTTTGTACGGTGAA	AAATGGGCCAGTGGTTGTAT	FAM
	AG Ipa 357	AC	110	TTCCGTCTCCACTAACTGGG	TGCGTGGAGTTTATCTCTGG	HEX
	AG Ipa 492	AG	92	GGAGAGAAGGAGAAAGAAGGG	GTGGTGCCTAGCCAGCTATC	NED
3	AG Ipa 214	AC	190	CAGTAATCTGAAGTCAGTGGAGCA	ATTAGGACTGACCTCCATCAC TC	FAM
	AG Ipa 187	AC	294	TCCAGTGCCAGGAGAAGTAA	TCTCCTCCTTTATGGCTTGTTT	FAM
	AG Ipa 406	AC	149	ATCCTCACCTTGCAGGAC	GTTTGGACTGCTCCTGCTG	HEX
	AG Ipa 387	AG	249	CGCAAGGTCTGTTTGCTAGA	CGGGATCTTGACTGGACATC	HEX
4	AG Ipa 139	AC	95	GCGTTTGCCTACCTAAAGCA	TCATTCTGAGCAGATGGTCG	FAM
	AG Ipa 478	AC	140	ATCCTTAACGTGTGTAGCAAAC	ATAATCTTTGACATCACTTTCA TGACT	HEX
<b>Larimus breviceps</b>						
1	AG Lbr 175	AC	159	GCCACCAGGAAGTTGACATT	CCGCCTAACTGAAGGATCAC	FAM
	AG Lbr 092	AC	277	TGTCAGCTGTCTGAACCGTC	GCAAACCCATCTCCACATTT	FAM
	AG Lbr 345	AC	149	CATACTTTGCCAACGGAGGT	CAGGTGAATCTCATACCCGC	NED
2	AG Lbr 195	AC	104	TGTGCTCACACTTCCTCTGG	CCACAGTCTCCCACTCATCA	FAM
	AG Lbr 060	AC	128	CCTCTCGGCTAAGGCTCTTT	TTATGCAATTGGTCTGGCAA	HEX
	AG Lbr 443	AC	115	CTAGCATCATGGACAGCGAC	GCGACAGTCAGCAGGACATA	NED
3	AG Lbr 301	AG	154	TTGAAGGTCAGGAAGACGCT	CTCAACATCCCACAGTGCAT	FAM
	AG Lbr 076	AG	176	GGTCTCACTCTCAGGGTTGC	ACTACGACTCCCATGATGCC	HEX
	AG Lbr 332	AC	98	GCTGCAGTGACCAATGTCTG	CAGCGGCTAATAAAGCGAAC	NED

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
	AG Lbr 499	AAC	107	GCAGCATGCTATATTCCGCT	CTGCTTCGCTCCTCTGAAAT	FAM
4	AG Lbr 331	AG	210	CAGCCGTCAACCAGACAATA	GAGTGGCATTGATTGCTGAA	FAM
	AG Lbr 372	AG	91	TTCTGAATGGTGGCAAACCTG	GCTTTCAACAGGCCCTCATA	HEX
<b><i>Pellona harroweri</i></b>						
1	AG Pha 427	AC	137	TGGTCTTTGAACCTGCCAAT	CTCACAAAGGAACATGCAGC	FAM
	AG Pha 205	AC	112	ACACTCAAAGAAGTGCCGCT	TGGCTGGTCTGGTGGTAGAT	HEX
	AG Pha 047	AC	111	AGTTTAGGTGTGCCTGGGTG	CAGCCTTGGTTAGCTGCTCT	NED
2	AG Pha 097	AG	130	GGGATAAGGGAGTGGAGAGG	TGTTTCACTTGACTCCCACG	NED
	AG Pha 268	AC	249	CTTTGTGGGCAGAGTCTCGT	GTGGCCATGCAGTCAACTAA	NED
3	AG Pha 215	AC	137	AGAGGCACGTCTGCAATCTC	CCTATTGATTCACGGTGGCT	FAM
	AG Pha 050	AAAC	146	CTTTGGGCATTTAGCCATGT	CCTTGAGGGTGACCAATGAT	HEX
	AG Pha 353	AC	291	GGAGGAAGACCAGGTGTGAA	TTTGGGTGCTGTGTAAACCC	HEX
	AG Pha 122	AC	97	CTCTGCCTTCCTGCTCTTTG	GGCTGTAGGCACCACAGTTT	NED
4	AG Pha 300	AC	105	TCAGGCCTACTCATGCCATT	GATGCTTCCTCGGTGTTAGC	FAM
	AG Pha 365	AC	153	GAGAACATGGAGCCAAGCAT	GCGCAACATGTCAGTAGGTC	HEX
	AG Pha 231	AAC	109	TGGGTGGTCTAGCCCATTAG	CCTCAGATTGAGGAGGCAGT	NED
<b><i>Trinectes paulistanus</i></b>						
1	AG Tpa 317	AC	114	ACAGTGTGGATCTGCCTCCT	CCCACCTCATTCACTTGCTT	FAM
	AG Tpa 402	AG	171	CACCAAGGACAGGAAGTGCT	TTTGGGAGCTTGTCACCTCT	HEX

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
	AG Tpa 421	AG	132	TCAAGCACGTAGCACGAGAC	TTCCTGATGGGATTACTGGG	NED
2	AG Tpa 035	AAC	121	ACCTTCATCACCTGGTCAGC	GCACGAGTTCAATCAGCAAA	FAM
	AG Tpa 458	AC	92	ATGAGCTGCCTCTGTCTCGT	TGAGAACCACAACCTCCATCG	HEX
	AG Tpa 231	AC	152	GGCCTACAGTAACGGCAGAG	GTGTGCCAGGAAAGGAAGAA	NED
3	AG Tpa 168	AG	169	TCACCCTCCTCTGCCACTAC	ATCCACAGGAACTGTTTGC	HEX
	AG Tpa 251	AAC	101	TTGCCCTTGAAACAACATCA	CATTAAAGCGTCGCCAACT	NED
4	AG Tpa 472	AC	154	TTGTGGGTAATTTGGGCTGT	TACTGAGCAGCAGTGGAGGA	FAM
	AG Tpa 331	ATC	159	GTTTGTGTCGTTTGTGCGTC	TTGTGTTGTCACACCCTGCT	HEX
5	AG Tpa 144	AC	120	TTCGCTCTGCACAGACAGTT	ACCAGGGAGCGAAATTAGGT	HEX
	AG Tpa 395	AC	172	GACGAGGCGTTGTGTAGTGA	TTGGTCGTGAGGTTTGAAT	NED
<b><i>Mycteroperca interstitialis</i></b>						
1	AG Min 436	AAC	96	CATAGAACAGAAGCCATGCAA	CCCAGTATGTCACAGCATGTC	FAM
	AG Min 047	AC	134	CCAATCTGCAGCCCATAACT	TTGGTTCGTGGACATTTGTT	HEX
	AG Min 287	AC	98	GACCACAGAACCACATTCACC	TGTATGGTAACCTCGGCCAC	NED
2	AG Min 360	AC	100	TCACCTTCCTCTGTGTGTCCT	ACAAGCTCCACCGATCAAAT	FAM
	AG Min 082	AC	148	GCAGCCTAGGATTCAGTTCC	AGGAAGGCAGACTGAAAGGG	HEX
	AG Min 289	AC	91	GGGTTACTCTCACCCCTAAATAAA	CTGTAGCGAGCTGGTCATTG	NED
	AG Min 019	AATG	192	GATAGTCTGGCGACCTGTCC	GAGGTAACATGTGCGCTGAA	NED
3	AG Min 497	AC	161	TATCAAACCTCGTTAGGCCGC	TTGTCGCCACTCTTTCTTGA	FAM

Multiplex	Locus	Motificação	Tamanho do fragmento	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Fluorescência
	AG Min 276	AC	90	TCTTTATAAGGTCACCTTGAGTATCA GA	ATCAGCACCTGCATGCCT	NED
4	AG Min 341	AC	91	TGCTCCTCTGTCAGTGTTGG	GCGCTTGAGACAGTCAGTTCT	FAM
	AG Min 344	AC	191	TCCTTGGTGGCTGGCTGT	CCCGCTTTGGACTGAAAGT	FAM
	AG Min 206	AC	95	CCATCTGTAGTGTGCAGGC	TGTCTCAGTTGTGTGTGTCCG	NED

### 8.3 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

As sequências de DNA obtidas foram alinhadas e editadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999). A amplitude e os espaçamentos dos picos foram devidamente observados para atestar a qualidade das sequências e verificar se as mutações eram reais ou se poderiam ser artefatos da técnica do sequenciamento. A identidade das sequências foi confirmada utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) no NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Todas as amostras foram alinhadas entre si, gerando um arquivo que foi utilizado na realização de testes estatísticos posteriores. Para a determinação do número de haplótipos e de sítios segregantes (S), frequência e diversidade de haplótipos, assim como valores de diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) e haplótica (Hd), foi utilizado o programa *DNA SP Sequence Polymorphism* (ROZAS et al., 2003).

A matriz de distância genética, a distância genética entre filogrupos e a árvore de haplótipos foram obtidas utilizando o programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2011). A rede de haplótipos foi criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo *Median-Joining* utilizando o programa Popart (LEIGH & BRYANT, 2015).

O coeficiente FST mede a razão entre a deriva genética e o fluxo gênico e o modo como esta razão influencia a estrutura populacional quando se consideram os processos, sendo uma das medidas de estrutura populacional mais utilizadas na genética evolutiva. (TEMPLETON, 2011). Os cálculos do FST foram feitos com a aplicação do programa Arlequin 3.01 (EXCOFFIER et al., 2005).

Para avaliar a neutralidade do processo de seleção natural foram usados os testes de  $F_s$  de  $F_u$  e  $D$  de Tajima executados no programa DnaSP. Se o resultado destes testes indicarem não significativos podemos dizer que as populações estão em equilíbrio genético. Estes testes de neutralidade também foram usados como indicadores de recente expansão populacional quando a hipótese nula de neutralidade for rejeitada devido a valores negativos significativos ( $p < 0,05$ ). Para estimar os valores  $F$  e  $D$  de  $F_u$  e  $L_i$  que são testes de neutralidade mais sensíveis aos eventos de seleção foi utilizado o software Arlequin 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

### 8.4 ANÁLISES DA GENOTIPAGEM

A determinação do tamanho dos alelos foi realizada utilizando-se o programa GeneMarker v.1.6 (Soft Genetics LLC), através da comparação com o marcador de peso molecular GeneScan 500 ROX Size Standard (Thermo Fisher Scientific).

Cada locus foi avaliado em termos de valores ausentes e aqueles com mais de 20% foram removidos das análises. O software Micro-Checker, versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi usado para verificar a presença de gagueira de microssatélites e grandes perdas de alelos, enquanto as

frequências de alelos nulos foram determinadas usando o software FreeNA através do algoritmo Excluding Null Alleles (ENA), com base em 10.000 réplicas de bootstraps (CHAPUIES & ESTOUP, 2007). O número de alelos (NA), riqueza alélica média (AR), heterozigosidade observada (HO), heterozigosidade esperada (HE) e coeficiente de endogamia (Fis) por locus e por local de coleta foram avaliados usando a função `divBasic` de "diveRsity" pacote (KEENAN et al., 2013) no software R (<http://www.r-project.org/>). Os intervalos de confiança de AR e Fis em 95% também foram calculados usando a função `divBasic` no pacote "diveRsity" R (KEENAN et al., 2013). Alelos privados e por local de coleta foram determinados usando os pacotes R "poppr" (KAMVAR et al., 2014). O teste geral de desequilíbrio de ligação é baseado na hipótese nula de que não há ligação entre os loci. Dois índices são calculados e testados: o índice de associação ( $I_a$ ) e a medida de correlação ( $r_{barD}$ ). A significância foi testada com base em 999 permutações e realizada usando as funções `ia` e `pair.ia` no pacote R "poppr" (KAMVAR et al., 2014). O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada local foi testado usando 2.000 permutações de Monte Carlo no pacote `DiveRsity` do pacote R por meio da função `divBasic` (KEENAN et al., 2013). Os níveis de significância foram ajustados aplicando a correção sequencial de Bonferroni sempre que múltiplos testes eram realizados. A probabilidade de cada locus estar sob seleção foi calculada usando o programa `BayeScan v.2.1` (FOLL & GAGGIOTI, 2008), com base em probabilidades anteriores de 10, 20 execuções piloto com 5.000 interações cada e 100.000 interações com burn-in de 50.000. Uma probabilidade superior a 0,76 é considerada pela escala de evidências de Jeffreys para os fatores de Bayes como uma evidência substancial de seleção.

Comparações globais de pares  $F_{st}$  e  $F_{st}$  (WEIR & COCKERHAM, 1984) entre os locais foram realizadas usando o software FreeNA (CHAPUIES & ESTOUP, 2007) para dados corrigidos e não corrigidos para alelos nulos. Usamos 10.000 replicações de bootstrap para suporte estatístico. Um Wilcoxon Rank Sum Test foi realizado no software R para verificar se há alguma diferença significativa entre  $F_{st}$  com e sem correção ENA.

Foi implementado análise de agrupamento bayesiana baseada em modelo no STRUCTURE v2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000), usando 10 execuções para cada população inferida ( $k = 1-10$ ), cada uma com um burn-in de 100.000 iterações e 1.000.000 Etapas do MCMC. O número provável de clusters ( $k$ ) em execuções replicadas foi acessado usando o método de Evanno (EVANNO et al., 2005) em Structure Harvester (EARL & VONHOLDT, 2012). Análise discriminante de componentes principais (DAPC) também foram realizados usando o pacote R "adegenet" (JOMBART, 2008; JOMBART et al., 2011) para determinar os padrões espaciais da estrutura genética da população e plotados usando "factoextra" e "ade4" (CHESSEL et al., 2004) Pacotes R, respectivamente. Ao contrário de STRUCTURE, o DAPC não requer um modelo genético de população a priori para identificar clusters, use um modelo no qual a variação genética se concentra principalmente na variabilidade entre grupos e não principalmente no componente dentro do grupo, e é mais rápido, resultando em dados de estrutura populacional muito complexos (JOMBART et al., 2010). Para a análise DAPC, a função `find.clusters` também de "adegenet" foi usada para determinar o número ótimo de clusters ( $k$ ), que

emprega um método de critério de informação Bayesiano (BIC) (JOMBART et al., 2010, 2011). Uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) também foi realizada usando o pacote R “poppr” (KAMVAR et al., 2014), com base em 999 eventos de permutações, para avaliar a distribuição da variação genética para estuarinos entre os organismos amostrados no estuário do Rio Doce e dos demais estuários, pois o estuário do Doce foi a área mais impactada. Já para os peixes recifais a área 3 foi considerada a mais impactada por englobar a região de desembocadura do Rio Doce.

## 9 TELEMETRIA ESTUARINA

### 9.1 ÁREA DE ESTUDO

O presente estudo foi desenvolvido nas fozes dos Rios Doce e São Mateus e áreas marinhas adjacentes, localizadas no litoral norte do Espírito Santo. As regiões estuarinas desses rios estão localizadas no distrito de Regência, cidade de Linhares (Rio Doce) e na cidade de Conceição da Barra (rio São Mateus) (Figura 11).

Figura 11: Área de estudo no litoral norte do Espírito Santo, Brasil





## 9.2 COLETA DE DADOS

Para o estudo de telemetria estuarina foram selecionadas duas espécies de robalos (*Centropomus parallelus* e *C. undecimalis*) em razão da alta importância econômica, social e recreativa destas nas áreas estudadas (RODRIGUES, 2005). Uma vez que os robalos são eurihalinos, ou seja, vivem tanto na água doce quanto salgada (GRACIA-LOPEZ et al., 2006), a compreensão da movimentação entre os ambientes de água doce, estuarino e marinho, é fundamental para a determinação de possíveis impactos causados pelo Rompimento da Barragem de Fundão sobre a dinâmica destas espécies.

O sistema de rastreamento utilizado no estudo de telemetria estuarina é composto por transmissores e receptores acústicos da VEMCO®, líder mundial no segmento. No presente estudo foram utilizados dois tipos de transmissores (contínuo e codificado) que emitem sinais acústicos singulares e identificáveis; e seus respectivos receptores (VR100 e VR2W). Para telemetria passiva foi montado um grid de detecção com oito receptores VR2W em cada um dos rios estudados para o monitoramento dos indivíduos marcados com transmissores codificados. Enquanto na telemetria ativa foram realizadas campanhas intensivas de busca ativa dos indivíduos marcados com transmissores contínuos, utilizando embarcação e um hidrofone unidirecional conectado ao receptor VR100.

Exemplares de robalo foram capturados através de métodos não letais para o implante dos transmissores acústicos. Todos os indivíduos foram previamente anestesiados e uma incisão de 20 mm realizada na cavidade celomática para a inserção do transmissor acústico. Após a sutura do corte os indivíduos foram monitorados por cerca de 20 minutos, sendo posteriormente devolvidos ao rio.

Para obtenção dos dados de telemetria passiva, os receptores VR2W fundeados foram recuperados através de mergulho autônomo em outubro de 2020. Foram recuperados cinco e sete receptores, respectivamente, nos Rios Doce e São Mateus. Para obtenção dos dados de telemetria ativa, foram realizadas duas campanhas intensivas de 12 dias de rastreamento em 2019 em cada rio estudado (Ano 1, totalizando um esforço de campo de 192 horas em cada rio), e uma campanha intensiva de 12 dias de rastreamento no Rio Doce em 2021 (Ano 3, totalizando um esforço de campo de 96 horas). Nesta última campanha de telemetria ativa realizada entre abril e maio de 2021 no Rio Doce, os indivíduos marcados foram monitorados durante três dias consecutivos em cada fase lunar, no período diurno e noturno, totalizando 12 dias de amostragem e abrangendo um ciclo lunar completo (aproximadamente 28 dias). Para maiores detalhes sobre a metodologia de coleta de dados ver Protocolo de Telemetria estuarina.

## 9.3 ANÁLISES DE DADOS

Para definição da área de vida foi utilizado o método de Densidade de Kernel (KUD) (WORTON, 1989). O método KUD é uma abordagem probabilística que oferece uma densidade de uso em toda

a área de estudo. O uso do espaço é frequentemente apresentado como uma distribuição de probabilidades por uma função de distribuição do uso (VAN WINKLE, 1975), que dá a densidade de probabilidades de realocar os indivíduos em qualquer lugar conforme as coordenadas geográficas.

Índices de residência (IR) e fidelidade (IF) foram estimados com o intuito de verificar possíveis diferenças na permanência dos indivíduos dentro das áreas de estudo. O índice de residência foi calculado considerando o número de dias com detecções sobre o número total de dias em liberdade (número de dias entre a soltura e última detecção) para cada indivíduo. O índice de fidelidade foi baseado no número de horas com detecções sobre o número total de horas em liberdade (número de horas entre a soltura e a última detecção) para cada indivíduo.

Os dados registrados nos receptores foram obtidos através do *software* VUE - VEMCO®, sendo posteriormente validados de modo a eliminar das análises possíveis ruídos captados e sinais de fraca intensidade (< 60 dB) (ver CLEMENTS et al., 2005; YOUNG et al., 2016). As análises de distância percorrida e KUD foram realizadas através do website *Zoatrack* (<https://zoatrack.org>) (DWYER, 2015) e do *software R* (R Core Team, 2017), através do pacote *AdeHabitatHR*. As médias de profundidade, distância percorrida, KUD50, KUD95, IR e IF foram comparadas entre os Rios Doce e São Mateus através do teste de *Mann-Whitney* com a utilização do *software* Statistica12.

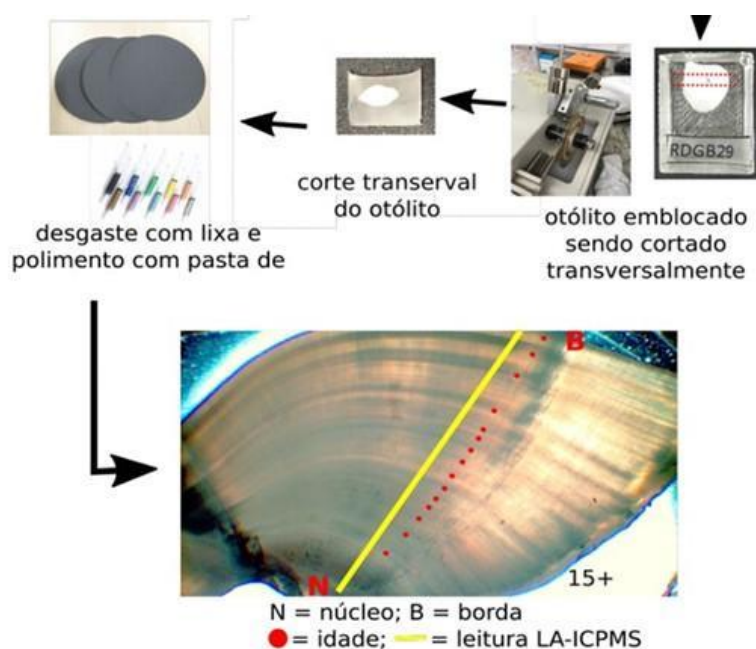
Para avaliar o efeito dos fatores abióticos sobre a presença e ausência dos robalos na foz do Rio Doce, foram utilizados Modelos Aditivos Generalizados Mistos (GAMM), implementados com o pacote *gamm4* (WOOD & SCHEIPL, 2020) na linguagem de programação R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2021). A análise foi restrita aos indivíduos que foram detectados por pelo menos 30 dias ( $n = 6$ ) na rede de receptores da foz do Rio Doce. A presença-ausência dos indivíduos foi examinada em uma base diurna-noturna ~12h, independente do receptor, usando uma estrutura de erro binomial e função de link logit. A avaliação foi feita a nível de unidade populacional, entretanto, a identificação dos indivíduos (ID) foi incluída como um efeito aleatório nos termos do intercepto e coeficiente angular dos GAMMs (BOLKER et al., 2009; WHORISKEY et al., 2019). Os dados de temperatura da água, pH, turbidez e salinidade (*i.e.*, condutividade) foram obtidos da estação automática RDO-16, localizada na foz do Rio Doce (-19.644419 S, -39.819295 W). Adicionalmente, o número de dias após o evento de marcação e a porcentagem iluminada da lua (0 a 100) foram incluídas como variáveis preditoras. Devido a existência de correlação (Pearson) entre as variáveis preditoras pH e salinidade ( $r^2 = 0,60$ ), oxigênio dissolvido (OD) e temperatura ( $r^2 = -0,80$ ), e OD e turbidez ( $r^2 = -0,44$ ) essas não foram incluídas no mesmo modelo (ZUUR et al., 2009). Para fins de normalização, as variáveis turbidez e número de dias após a marcação foram log-transformada e raiz-transformada, respectivamente. Na etapa de elaboração de modelos foram construídos e avaliados 40 GAMMs, com diferentes combinações das variáveis preditoras para variável resposta. Dentre as variáveis preditoras, a salinidade foi a única variável que, em comparação ao modelo nulo (apenas o intercepto), não melhorou o ajuste do modelo. Desta forma, a salinidade não foi incluída nos modelos contendo mais que uma variável preditora. O critério de informação de Akaike (AIC) foi utilizado para seleção dos modelos (ZUUR et al., 2009).

## 10 MICROQUÍMICA DE OTÓLITOS

Foram escolhidas três espécies de interesse comercial, abundantes e amplamente distribuídas ao longo da costa do Espírito Santo (rios São Mateus, Ipiranga e Rio Doce) e sul da Bahia (Caravelas). Desta forma, foram selecionadas *Centropomus parallelus* (robalo-peva), *C. undecimalis* (robalo-flecha) e *Genidens genidens* (bagre-guri) as mais abundantes ao longo da campanha de amostragem, e que atendem aos demais pressupostos para escolha. Os exemplares foram coletados utilizando redes de espera de diversas malhas, operadas por pescadores locais e equipe de campo. Além disso, exemplares também foram obtidos nas peixarias de cada região, certificando-se do local de origem deles.

Após a coleta, os indivíduos foram medidos (comprimento total – CT, em mm), pesados (PT – g) e dissecados para retirada dos otólitos. No laboratório os otólitos foram limpos em câmara de ultrassom para retirada dos tecidos aderentes. Posteriormente foram emblocados em resina epóxi, cortados transversalmente, lixados e polidos até o plano do núcleo (Figura 12).

Figura 12: Resumo esquemático das etapas e procedimentos realizados para análises de microquímica de otólitos



Após o processamento, os otólitos foram fixados em lâminas de vidro para posterior análise (Figura 13). As concentrações elementares isotópicas nas seções transversais dos otólitos foram medidas usando um sistema de Ablação a Laser (AL), acoplado a um ICP-MS do Departamento de Petrologia e Metalogenia da UNESP de Rio Claro, SP. As abundâncias dos isótopos  $^{24}\text{Mg}$ ,  $^{44}\text{Ca}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{86}\text{Sr}$  e  $^{138}\text{Ba}$  foram determinadas do núcleo até a borda das seções do otólito. As configurações de AL foram: diâmetro do feixe 50  $\mu\text{m}$ , fluência 12 J  $\text{cm}^{-2}$ , taxa de repetição 10 Hz, velocidade de

varredura 10  $\mu\text{m s}^{-1}$  e saída de energia 100% (máximo de 5,6 mJ). O hélio foi usado como gás de arraste na ablação, o qual foi misturado com argônio para injeção no plasma ICP-MS.  $^{43}\text{Ca}$  foi utilizado como padrão interno, com uma concentração na matriz do otólito estimada em 36%. O padrão para microanálises de carbonatados, MACS-3 (United States Geological Survey, US) foi analisado ao longo de cada dez otólitos, a fim de calibrar a conversão entre contagens por segundo em concentração elementar em relação a um elemento químico padrão (em ppm) e para corrigir desvios de máquina e viés de massa (WEBB et al., 2012; SIROT et al., 2017). Para evitar qualquer contaminação da superfície, uma pré-ablação de 85  $\mu\text{m}$  foi realizada antes das principais transecções de 50  $\mu\text{m}$ . Todos os dados isotópicos são dados como concentração em relação a  $^{43}\text{Ca}$  (Elemento:Ca) x 1000 ppm.

Figura 13: Lâminas de vidro contendo os otólitos para análise no LA-ICP-MS



Para verificar as concentrações das razões elemento:Ca da borda do otólito (porção do otólito que representa o local de captura) entre os quatro estuários, foram realizadas análises de variância multivariada não paramétrica de Kruskal Wallis, através do pacote *agricolae* no ambiente R, com significância de 95% e p valor corrigido pelo método de Bonferroni. Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



## 11 TELEMETRIA RECIFAL

### 11.1 MARCAÇÃO

Os estudos envolvendo telemetria foram realizados seguindo metodologia proposta por HACKRADT (2012). A espécie *Mycteroperca bonaci*, badejo-quadrado, foi escolhida para a realização do estudo de movimentação e comportamento devido a sua importância econômica e ecológica (predador), podendo atuar como um bioindicador de impacto ambiental (KOCK, 2011). O *Mycteroperca bonaci* (Figura 14) foi selecionado para o estudo de telemetria de peixes recifais por ser uma espécie de alto valor econômico e alta relevância no ecossistema (FREITAS, 2014; PREVIEIRO, 2018). Ao ser um organismo predador de topo de cadeia alimentar (FREITAS, 2014) o badejo-quadrado (*M. bonaci*), atua controlando as populações de suas presas através de um sistema *top-down* (BOADEN & KINGSFORD, 2015).

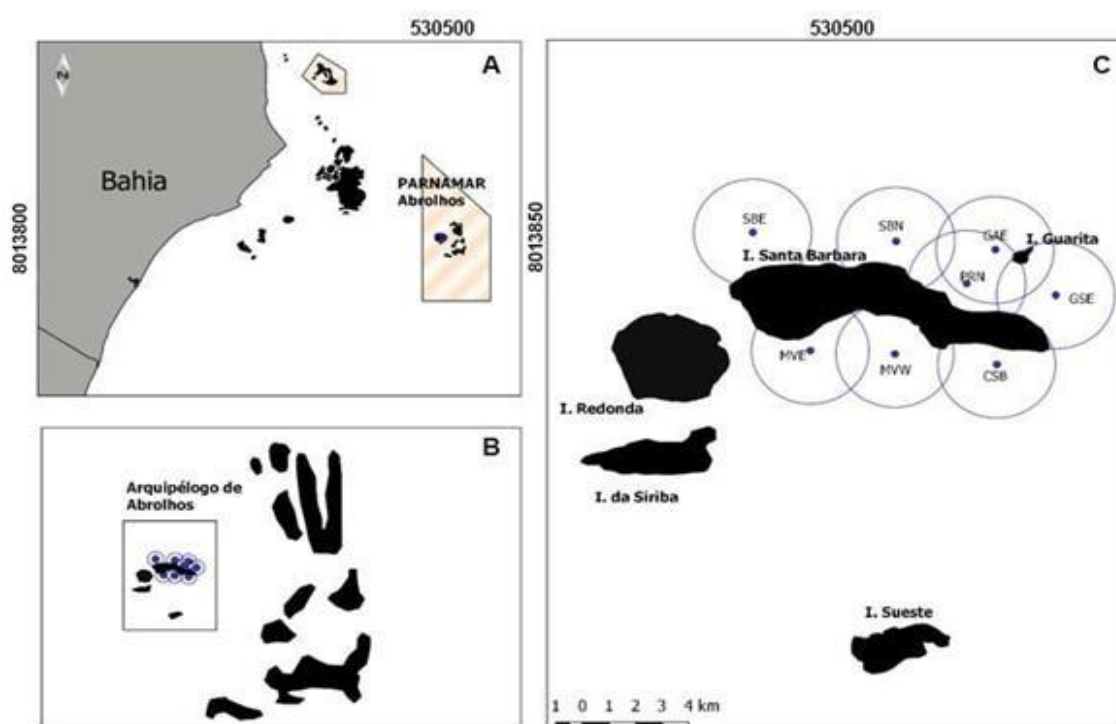
Figura 14: Coleta de dados das atividades de telemetria de peixes recifais; A) Badejo quadrado, *Mycteroperca bonaci*, espécie-alvo do estudo de movimentação, B) covos utilizados na captura dos espécimes, C) esvaziamento da bexiga natatória previamente a cirurgia, D) incisão para implantação do *tag* acústico, E) soltura e acompanhamento do animal marcado com uma *tag* externa identificadora



Para o monitoramento dos *tags* codificados (emitem um *ping* a cada 30 segundos) se é necessário determinar o alcance dos hidrofones móveis (VR100), através da condução de uma prova de intervalo de detecção. Com base neste estudo prévio, foi elaborado um plano de amostragem móvel a ser realizado com o VR100. A área de estudo e sua área de entorno foram monitoradas periodicamente através do uso de hidrofone, direcional (VH110), utilizado a partir da embarcação de monitoramento. Associado ao hidrofone móvel foi acoplado uma rede de hidrofones fixos (VR2W)

(Figura 15). Os animais, ao se moverem dentro da rede de hidrofones, foram sequencialmente detectados por eles dentro de sua área de detecção.

Figura 15: Mapa da malha de detecção de hidrofones fixos (VR2W) no PARNA de Abrolhos. A) Mapa da localização da área de estudo, indicando a localização do PARNA Abrolhos; B) Indicação do Arquipélago de Abrolhos (onde o estudo está sendo realizado) e o parcel dos Abrolhos em seu entorno e C) localização da malha de detecção formada pelos receptores VR2W no entorno da Ilha de Santa Bárbara - Arquipélago de Abrolhos (Os pontos indicam localização do VR2W e os círculos a área de detecção calculada - 300m - para cada hidrofone).



Para captura dos peixes, foram utilizados covos, puçás e anestésicos para a captura de espécies que se refugiam em covas e grutas. Após capturados, os peixes foram levados ao barco e colocados em um tanque contendo água do local, e tiveram suas bexigas natatórias totalmente esvaziadas com o auxílio de uma agulha hipodérmica de 18 polegadas. Todos os peixes capturados foram pesados e mensurados (CT em mm). O *tag* codificado esterilizado com iodo foi inserido na cavidade peritoneal e em seguida a fechada e limpa a incisão. Implantou-se uma marca externa em cada peixe capturado (*tag*), onde cada etiqueta tem um código numérico que permitiu a identificação e o acompanhamento do animal e uma cor distinta para cada local de amostragem. Essa cor permitiu identificar os movimentos dos peixes do local onde foram marcados para diferentes locais. Aplicou-se antisséptico no local da inserção da etiqueta para evitar possíveis infecções.

Após a captura, os peixes foram acomodados em uma cama cirúrgica e receberam uma pequena incisão de 10 a 20 mm de comprimento entre as nadadeiras peitorais, sendo inserido o transmissor codificado acústico (15 indivíduos foram marcados com *tags* codificados), posteriormente fechada a incisão com cola cirúrgica, além de ser aplicado antisséptico. Os animais foram mantidos no tanque



com água do mar e oxigenado com auxílio de um aerador antes de serem liberados para que seja assegurado que estão em boas condições. Mergulhadores acompanharam os peixes até o local em que foram capturados.

A manutenção dos receptores e leitura dos dados foram realizados trimestralmente sendo a última descarga ocorrida em março de 2020, sendo impossibilitado novas leituras e manutenção dos receptores devido a paralisação das atividades de campo decorrente da pandemia e necessidade de isolamento social. O monitoramento ativo dos animais, a partir do uso do VR100 foi realizado em novembro de 2019 com nove dias de campo.

O rastreamento foi feito utilizando-se um hidrofone direcional (VH110) acoplado a um localizador receptor sistema VR100 (VEMCO®). Foram feitos transectos de 10 minutos em cada local de marcação. Quando nenhum peixe era detectado, outro local foi visitado. Quando havia sinal positivo, o barco era posicionado para adquirir o sinal mais forte possível a partir do transmissor e seguir o sinal detectável. Quando o sinal era perdido, continuou-se o transecto até os 10 minutos estarem completos. Quando um novo sinal era detectado pelo receptor móvel, se prosseguia para completar o rastreamento com este novo peixe. O rastreamento foi feito até que o sinal do animal fosse perdido, atingindo o máximo de 45 minutos em um único local. Os peixes etiquetados foram monitorados através de censos visuais subaquáticos realizados em cada local de marcação.

## 11.2 ANÁLISES DE DADOS

Dados do VR2W foram descarregados com auxílio do *software* VUE (Vemco®) e introduzidos em uma matriz de dados do Excel. Falsas detecções foram eliminadas previamente ao início das análises. A taxa de residência total e por receptor foi calculada através da razão do número de dias em que o animal foi registrado em um determinado receptor ( $IR_i$ ) ou no *grid* de detecção ( $IR_T$ ) pelo número total de dias de monitoramento. Os dados registrados nos receptores foram obtidos através do *software* VUE - VEMCO®, sendo posteriormente validados de modo a eliminar das análises possíveis ruídos captados e sinais de fraca intensidade (< 60 dB) (CLEMENTS et al. 2005; YOUNG et al. 2016). As análises de distância percorrida e MPC foram realizadas através do *software* R (R CORE TEAM, 2017), através do pacote AdeHabitatHR (CALENGE, 2019).

Para análise dos dados depois de seleção e remoção de detecções falsas, sem posição de GPS, foi estimado o Polígono Convexo Máximo (MCP) que indica toda a área utilizada por um indivíduo.

Adicionalmente, uma estimativa de Área de Vida Linear (*Home range linear*) foi usada como *proxy* da dispersão horizontal dos indivíduos, dada em metros. Com a finalidade de avaliar se indivíduos maiores possuíam maior potencial de dispersão, uma regressão linear entre o *home range linear* e o tamanho dos indivíduos foi realizada.