

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA
E MARINHA (ANEXO 7 – ICTIOFAUNA)**

**SUB-PROJETO: ESTUDO E MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA
DULCÍCOLA - ECOLOGIA DE PEIXES**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Jorge Dergam	Coordenador do Projeto	UFV
Luiz Fernando Duboc	Coordenador sub-projeto	CEUNES - UFES
Profissional Mestre II/Profissional Pleno II	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Júnior (Biólogo)	Pesquisador	UFES - CEUNES
Profissional Júnior (Biólogo)	Pesquisador	UFES - CEUNES
Pós-doutorado	Pesquisador	UFV
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES - CEUNES
Iniciação Científica	Pesquisador	UFES - CEUNES
Pós-doutorado	Pesquisador	UFES - CEUNES

2. ESCOPO

Análises ecológicas de amostras de peixes de ambientes dulcícolas.

3. OBJETIVO

Determinar parâmetros ecológicos das espécies coletadas em ambientes dulcícolas, conforme realizado na análise diagnóstica obtida com coletas mensais no primeiro ano, das espécies de peixes coletadas nos 8 pontos indicados no TR Monitoramento Cláusula 165, Anexo 7. Nestes primeiros 12 meses, serão obtidos os parâmetros ecológicos (comunidades, populações e relações com habitat). A partir dos resultados obtidos, deverão ser escolhidas as espécies a serem monitoradas quanto aos parâmetros populacionais (dieta/ecologia trófica, reprodução e recrutamento).

A integridade ambiental será aplicada conforme proposta por Nessimian et al. (2008), utilizando a ficha de campo apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Características do habitat utilizados na avaliação de sítios de amostragem para cálculos de índice de integridade de habitat. Fonte: Nessimian *et al.* (2008).

Padrão de uso da terra além da zona ripária:	
Floresta primária contínua / fragmento de 1.000.000 m ² / fragmento 100.000m ²	6
Floresta secundária alta/Floresta secundária mista	5
Floresta secundária baixa	4
Pastagem	3
Culturas perenes	2

Culturas de ciclo curto / solo exposto	1
Largura da mata ciliar:	
Floresta contínua	6
Floresta com largura entre 30 e 100 m	5
Floresta com largura entre 5 e 30 m	4
Floresta com largura entre 1 e 5 m	3
Floresta ripária ausente, mas com algumas espécies arbustivas e árvores pioneiras	2
Mata ciliar e vegetação arbustiva ausentes	1
Integralidade da mata ciliar:	
Mata ciliar intacta, sem pausas na vegetação	4
Interrupções ocorrendo em intervalos de 50 m	3
Pausas frequentes com erosões e machas a cada 50 m	2
Profundamente marcado por erosões ao longo de todo o seu comprimento	1
Vegetação da zona ripária a menos de 10 m de canal:	
Mais de 90% da densidade de plantas constituída por árvores não pioneiras ou arbustos	4
Misto de espécies pioneiras e árvores maduras	3
Misto de gramíneas, árvores pioneiras esparsas e arbustos	2
Gramíneas e alguns arbustos	1
Dispositivos de retenção:	
Canal com pedras e/ou troncos velhos firmemente fixados no local	4
Rochas e/ou trocos presentes, mas cobertos com sedimento	3
Dispositivos de retenção soltos, que se movem com o fluxo	2
Canal com areia e poucas obstruções	1
Sedimentos do Canal:	
Pouco ou nenhum alargamento do canal resultante do acúmulo de sedimentos	4
Algumas pedras e pouco silte	3
Sedimento formado por pedras; areia e silte comuns	2
Canal com presença de ilhas ou com fluxo alterado	1
Estrutura do banco:	
Bancos pouco visíveis	5
Bancos estáveis, formados por rochas e solo firme, apresentando gramíneas, arbustos ou raízes de árvores	4
Bancos firmes, mas nem sempre mantidos por gramíneas e arbustos	3

Bancos de terra solta mantidos por uma camada esparsa de gramíneas e arbustos	2
Bancos instáveis, facilmente alteráveis, com terra solta ou areia	1
Erosão:	
Pouca, não evidente ou restrita a áreas com apoio da raiz	4
Somente em curvas e estreitamentos	3
Frequente, erosão das margens e raízes	2
Erosão severa ao longo do canal, queda de bancos	1
Leito do rio:	
Fundo de pedra de vários tamanhos, interstícios evidentes	4
Fundo de pedras que se movem com facilidade, com pouco silte	3
Fundo de silte, cascalho e areia, estável em alguns lugares	2
Fundo instável e uniforme de areia e silte, substrato rochoso ausente	1
Corredeiras e piscinas, ou meandros:	
Distintos, ocorrendo em intervalos de 5-79 de largura	4
Irregularmente espaçados	3
Piscinas longas separam corredeiras curtas, meandros ausentes	2
Meandros e corredeiras/piscinas ausentes	1
vegetação aquática:	
Quando presente, consiste de musgos e manchas de algas	4
Algas dominantes em piscinas, plantas vasculares ao longo da borda	3
Tapetes de algas presentes, algumas plantas vasculares, poucos musgos	2
Tapetes de algas cobrem a parte inferior, plantas vasculares dominam o canal	1
Detrito:	
Consistindo principalmente de folhas e madeira, sem sedimento	5
Consistindo principalmente de folhas e madeira, com sedimento	4
Poucas folhas e madeira, detritos orgânicos, com sedimento	3
Sem folhas, galhos e troncos, matéria orgânica fina e grossa, com sedimento	2
Sedimento anaeróbico fino, sem matéria orgânica grossa	1

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Estudo de Comunidade

Determinar a ocorrência, abundância, biomassa e tamanho dos indivíduos. Obtenção de dados sobre alimentação e ecologia trófica (origem do alimento, fontes de carbono, posição no nível trófico), reprodução e

recrutamento. Seleção de espécies a serem monitoradas.

Meta 2- Estudo Populacional

Análise por espécie, dos parâmetros populacionais. As comunidades serão monitoradas quanto à riqueza, dominância e diversidade. A relação das espécies com o habitat avaliado nas espécies selecionadas.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
Caracterização da ecologia da ictiofauna, a partir de resultados obtidos em coletas mensais, durante 12 meses, em 8 locais na porção dulcícola do rio Doce. Será feita a seleção de espécies de peixes, preferivelmente de grande porte e de relevância comercial, para estudos de alimentação e reprodução.	Jorge Dergam, Luiz Fernando Duboc
5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p>A composição ictiofaunística será apresentada em tabelas (total e por local de coleta), indicando para todas as espécies: nome científico, nome popular, número de coleta e locais de amostragem.</p> <p>Todas as espécies serão categorizadas como raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras e comerciais. Para avaliar a representatividade da amostra, será utilizada a abordagem da curva do coletor.</p> <p>A caracterização ambiental de cada ponto amostrado será realizada através do Índice de Integridade de Habitat (IIH) de Nessimian <i>et al.</i>, (2008).</p> <p>A descrição das comunidades será baseada nos seguintes índices:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Abundância relativa das espécies, em número e peso (MAGURRAN, 1988). 2) Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, com intervalos de confiança obtidos por meio da aplicação de procedimento bootstrap (MANLY, 1997); 3) Equitabilidade (SMITH, WILSON, 1996); 4) Constância de ocorrência (C) das espécies; 5) Coeficientes de similaridade/dissimilaridade; 6) Índice de Dominância (MCNAUGHTON, 1968) 	Jorge Dergam, Luiz Fernando Duboc
<p>Deverão ainda ser realizadas análises multivariadas, visando verificar o ordenamento dos pontos quanto à distribuição das espécies e quanto à influência das características ambientais/fisiográficas e geográficas dos pontos sobre a distribuição das espécies.</p> <p>Deverão ser selecionadas espécies de peixes, de preferência de grande porte e de interesse comercial, a fim de serem monitoradas futuramente através de telemetria.</p> <p>Para as espécies com ocorrência na Área Ambiental 1 e constantes nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, se não for possível a coleta dos dados sobre suas dinâmicas populacionais, será realizado um levantamento bibliográfico detalhando a biologia da espécie em questão. Serão determinados os estádios de desenvolvimento gonadal das espécies mais abundantes e das espécies de importância para a pesca, por meio da classificação de maturação gonadal.</p> <p>A classificação macroscópica das gônadas será validada microscopicamente para cada estágio.</p>	Jorge Dergam, Luiz Fernando Duboc

<p>Será determinado o tamanho médio em que metade da população possui gônadas desenvolvidas e aptas para a reprodução (L50), e o comprimento com o qual todos os indivíduos estão aptos a se reproduzir (L100), por sexos separados. Será determinada a variação temporal da frequência de estádios de maturação gonadal considerando o ciclo hidrológico completo.</p> <p>Será determinada a relação gonadossomática (RGS) de cada indivíduo, o Índice Gonadal (IG) e a variação temporal da RGS, de acordo com a metodologia proposta por Vazzoler (1996), e os resultados obtidos serão apresentados em gráficos.</p> <p>Se espécies ameaçadas de extinção forem coletadas, e que não seja possível sua devolução ao ambiente, estas também serão submetidas às análises descritas anteriormente.</p>	
--	--

A análise final incluirá a comparação dos resultados obtidos a partir dos dados do monitoramento com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

A composição ictiofaunística será ser apresentada na forma de tabelas (no seu total e discriminada por local de coleta), indicando para todas as espécies: nome científico, nome popular, número de coleta e locais de amostragem. As espécies serão também classificadas como: raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras e comerciais.

Para estimar a representatividade da amostra, será utilizada a abordagem da curva do coletor. Modelos de ajuste da curva serão utilizados para estimativas da riqueza total, como Jackknife 1 e 2, Chao 1 e 2, ACE e ICE, e Bootstrap (COLWELL, CODDINGTON, 1994). A comunidade será caracterizada com os seguintes índices:

- o Abundância relativa das espécies, em número e peso (MAGURRAN, 1988).
- o Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, com intervalos de confiança obtidos por reamostragem bootstrap (MANLY, 1997); Equitabilidade (SMITH, WILSON, 1996); Constância de ocorrência (C) das espécies, determinada com base no percentual e períodos em que cada espécie ocorre;
- o Coeficientes de similaridade/dissimilaridade, como os de Bray-Curtis, Sorensen, Morisita-Horn e Jaccard, para comparação entre localidades e ciclos de monitoramento (MAGURRAN, 1988); Índice de Dominância (MCNAUGHTON, 1968).

Serão realizadas análises multivariadas, visando verificar o ordenamento dos pontos quanto à distribuição das espécies (MANLY, 1997; GAUCH JR, 1986) e influência das características ambientais/fisiográficas/geográficas dos pontos sobre a distribuição das espécies (MANLY, 1997; TER BRAAK, SMILAUER, 2002).

Serão selecionadas espécies de peixes, de preferência de grande porte e de interesse comercial, a fim de serem futuramente monitoradas quanto à utilização do habitat através de telemetria, com o uso de estações acústicas para detectar transmissores acústicos implantados no corpo destas espécies previamente selecionadas.

Será realizado um levantamento na literatura, sobre as condições prévias ao acidente. No caso das espécies constantes nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, na impossibilidade de obtenção de dados sobre a dinâmica de populações das mesmas, será realizado um levantamento bibliográfico detalhando a biologia da espécie em questão.

Serão determinados os estádios de desenvolvimento gonadal das espécies mais abundantes e das espécies de importância para a pesca, por meio da classificação de maturação gonadal determinada por Vazzoler (1996) e Brito e Bazzoli (2003). A classificação macroscópica das gônadas será estatisticamente validada microscopicamente.

Finalmente, será determinado o tamanho médio em que metade da população possui gônadas desenvolvidas, estando apta à reprodução (L50), e o comprimento com o qual todos os indivíduos estão aptos a se reproduzir (L100), por sexos separados, e será determinada a variação temporal da frequência de estádios de maturação gonadal considerando o ciclo hidrológico completo. Será determinada a relação gonadossomática (RGS) de cada indivíduo, o Índice Gonadal (IG) e a variação temporal da RGS, de acordo com a metodologia proposta por Vazzoler (1996). Os resultados obtidos serão apresentados em gráficos. Em caso de coleta de espécies ameaçadas de extinção, se não for possível sua devolução ao ambiente, estas também serão submetidas às análises descritas anteriormente.

A distribuição de pontos e a frequência amostral segue o que está definido no Anexo 7 do TR4.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Encontram-se listadas juntamente com as demais referências do Sub-Projeto a seguir.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA
E MARINHA (ANEXO 7 – ICTIOFAUNA)**

**SUB-PROJETO: ESTUDO E MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA
DULCÍCOLA - GENÉTICA**

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Tomas Hrbek	Coordenador sub-projeto	UFAM
Izeni Pires Farias	Membro de Equipe	UFAM
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFAM
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFAM
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFES
Profissional Mestre/Profissional Pleno	Pesquisador	UFES-UFES
Profissional Júnior	Pesquisador	UFES-UFV
Pos Doutorado	Pesquisador	UFES-UFAM
Pos Doutorado	Pesquisador	UFES-UFAM
Pos Doutorado	Pesquisador	UFV-UFAM

2. ESCOPO

Análises genéticas de amostras de peixes de ambientes dulcícolas

3. OBJETIVO

Determinar as espécies e a genética de populações das espécies de peixes coletadas na porção capixaba conforme Anexo 2.

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Genética de populações e DNA Barcoding.

Caracterização das espécies utilizando marcadores nucleares e microssatélites, e marcadores mitocondriais. Definição de 15 espécies-alvo de diferentes famílias para estudos genéticos populacionais.

Meta 2- Genética de populações das espécies-alvo

Análise por espécie, dos parâmetros de genética de populações.

5. PRODUTOS

<p>5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i></p>	<p>RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i></p>
---	--

<p align="center">Lista de 15 espécies de peixes a serem analisadas</p> <p>Sequências dos iniciadores dos 10 loci de microssatélites das 15 espécies</p> <p align="center">DNA extraído de 6600 amostras</p> <p align="center">Genótipos de 6600 amostras para 10 loci de microssatélites</p> <p>Sequências de 6600 amostras para 2 genes mitocondriais e nucleares</p> <p align="center">DNA barcodes de 5 a 10 amostras por espécie</p>	<p>Jorge Dergam, Tomas Hrbek</p>
---	----------------------------------

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i>
<p align="center">Obtenção de frequências alélicas e número de alelos privados</p> <p align="center">Obtenção de heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He)</p> <p align="center">Teste de desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) Estimativa de diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π)</p> <p align="center">Estimativa da endogamia</p> <p align="center">Estimativa da estruturação populacional (AMOVA e ϕ_{ST})</p> <p align="center">Estimativa da ocorrência de eventos de gargalo populacional</p> <p align="center">Análises com DNA <i>barcoding</i></p>	<p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Tomas Hrbek, Izeni Pires Farias</p> <p>Jorge Dergam</p>

6. METODOLOGIA

Amostras de DNA serão de 30 indivíduos de cada população serão extraídas de cada tecido, utilizando kits comerciais. Os 10 locos microssatélites, os 2 genes mitocondriais e os 2 genes nucleares serão amplificados via PCR padrão. Posteriormente adaptadores e identificadores (barcodes) individuais serão adicionados nos produtos do PCR. Os produtos do PCR serão sequenciados no IonTorrent PGM, as sequências resultantes separadas por indivíduo e por gene/microssatélite, e os bancos de dados serão montados para as análises. Parâmetros populacionais, tais como equilíbrio Hardy-Weinberg, heterozigosidade observada e esperada serão obtidos utilizando o software Genepop v 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). estatísticas de composição de nucleotídeos e padrões de substituições inferidos com a utilização do programa MEGA 7 (TAMURA et al., 2013). A análise de divergência de sequência será inferida com o modelo Kimura-2-parametros, K2P. Estatísticas de diversidade e polimorfismo de DNA serão obtidas: diversidade haplotípica h, diversidade nucleotídica π , partição da variância dentro e entre populações com e ocorrência de eventos de gargalo populacional utilizando ARLEQUIN, 2010). A análise de AMOVA permite a partição dos componentes de variância entre os níveis definidos em cada análises (por exemplo, dentro versus entre populações), considerando cada espécie por separado. A análise de AMOVA segundo Excoffier et al. (1992) estima índices de estrutura genética (endogamia e estruturação populacional) utilizando informação do conteúdo alélico dos haplótipos, assim como da sua frequência. A análise proposta por Excoffier et al. (1992) estende estudos anteriores de Cockerham (1973), Long(1986) e Long, Smouse e Woods (1987) sobre correlações alélicas entre demes para uma análise comparável da diversidade haplotípica. Este método substitui os parâmetros tradicionais F_{ST} e G_{ST} , pelos parâmetros ϕ_{ST} , ϕ_{ST} e ϕ_{SC} utilizando as seguintes correlações:

ϕ_{ST} é a correlação de haplótipos tomados ao acaso dentro das populações, em relação à correlação de pares de haplótipos tomados ao acaso da espécie;

ϕ_{ST} é a correlação de haplótipos tomados ao acaso dentro das populações, em relação à correlação de pares de haplótipos tomados ao acaso, dentro de toda a espécie;

ϕ_{SC} é a correlação de haplótipos tomados ao acaso, dentro de um grupo de populações, em relação à correlação de pares de haplótipos de toda a espécie.

A informação sobre as diferenças do conteúdo alélico entre os haplótipos é alimentado numa matriz euclidiana de distâncias elevadas ao quadrado. A significância dos componentes de covariância associada aos possíveis diferentes níveis de estrutura genética (intraindividual, intrapopulacional, dentro de grupos de populações e entre grupos) é testado com procedimentos de permutação não-paramétricos (Excoffier et al., 1992).

As análises de DNA *barcoding* serão realizadas atendendo o disposto no Termos de Referência 4 e na Nota Técnica CTBIO da seguinte forma: pelo menos 5 indivíduos de todas espécies coletadas em cada um dos locais de coleta ao longo do período do monitoramento e 10 indivíduos da família Characidae, em cada um dos locais. Adicionalmente será desenvolvida uma biblioteca de DNA barcodes para as espécies nativas da bacia que ainda não possuem a sequência registrada. Para a amplificação e sequenciamento dos segmentos serão utilizados os primers descritos por Ward et al. (2005). As sequências obtidas serão submetidas ao banco de dados BOLD (RATNASINGHAM, HEBER, 2013) (<http://www.boldsystems.org/>), para verificar a correspondência e similaridade com as sequências armazenadas no banco de dados. A identificação de Barcode gap e o “Barcode Index Number” (RATNASINGHAM, HEBERT, 2013) serão conduzidas por meio do site do *Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>). As sequências obtidas serão depositadas no banco de dados de forma a serem reconhecidas formalmente como sequências barcode das espécies em questão. Os registros conterão o nome da espécie, o voucher com os dados de catalogação e a instituição de depósito, dados de coleta como nome dos coletores, data e localização com coordenadas geográficas, nome do especialista que identificou a espécie, a sequência da região barcode com pelo menos 500 pb, informações sobre os primers utilizados na amplificação do fragmento de DNA e os respectivos eletroferogramas gerados de ambas as fitas de DNA (RATNASINGHAM, HEBERT, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brito, M.F.G. & Bazzoli, N. 2003. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 55: 624-633.

Cockerham, C. C. 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74: 679-700.

Colwell, R. K.; Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 345: 101-118.

Excoffier, L. & Lischer, H.E. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567

Excoffier, L., Smouse, E. & Quattro, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-191.

Gauch Jr., H.G. 1982. *Multivariate Analysis in Community Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press, 298 p.

Long, J. C. 1986. The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam- speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics* 112: 629-647.

Long, J.C.; Smouse, P.E.; & Wood, J.W. 1987. The allelic correlation structure of Gainj- and Kalam- speaking people. II. The genetic distance between population subdivisions. *Genetics* 117: 273-283.

Magurran, A.E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. London: Croom HEBN, 179 p.

Manly, B.F.J. 1997. *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*. 2ed. London: Chapman & Hall.

McNaughton, S.J. 1968. Structure and Function in California Grasslands. *Ecology* 49: 962-972.

- Nessimian, J.L.; Venticinque, E.M.; Zuanon, J.; De Marco JR., P.; Gordo, M.; Fidelis, L.; Batista, J.D.; Juen, L. 2008. Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams. *Hydrobiologia* 614: 117-131.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. 2007. BOLD: the barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P.D.N. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system. *PlosOne* 8: e66213.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. "GENEPOP Version 1.2: Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism." *Journal of Heredity* 86: 248-49.
- Smith, B. & Wilson, J. A 1996. Consumers' Guide to Evenness Indices. *Oikos* 76(1): 70-82.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Ter Braak, C.J.F. & Smilauer, P. 2002. *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5)*. Ithaca: Microcomputer Power, 500 p.
- Vazzoler, A.E.A. 1996. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EDUEM, 169 p.
- Ward, R. D.; Zemlak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R. & Hebert, P. D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 360: 1847-1857.

**ESTUDO E MONITORAMENTO AMBIENTAL DAS ÁREAS DULCÍCOLA-ES, ESTUARINA
E MARINHA (ANEXO 7 – ICTIOFAUNA)**

SUB-PROJETO: ESTUDO E MONITORAMENTO DA ICTIOFAUNA MARINHA

1. EQUIPE TÉCNICA

Nome	Função	Instituição
Maurício Hostim-Silva	Coordenador	UFES
Jean-Christophe Joyeux	Coordenador de sub-projeto	UFES
Ana Paula Cazerta Farro	Pesquisador	UFES
Athila Bertoncini Andrade	Pesquisador	UniRio
Carlos Werner Hackradt	Pesquisador	UFSB
Ciro Colodetti Vilar de Araujo	Pesquisador	UFES
Fabiana César Félix-Hackradt	Pesquisador	UFSB
Felippe Alexandre Lisboa de Miranda Daros	Pesquisador	UNESP/Campus Registro
Gabriel C. Cardozo Ferreira	Pesquisador	UFES
Helen Audrey Pichler	Pesquisador	UFES
Igor Emiliano Gomes Pinheiro	Pesquisador	FURG
Joelson Musiello Fernandes	Pesquisador	UFES
Julien Chiquieri	Pesquisador	UFES
Ryan Carlos de Andrades	Pesquisador	UFES

2. ESCOPO

Este estudo contemplará os produtos previstos para o **ano 1** do Termo de Referência (TR) 04 – Anexo 07 (Estudo e Monitoramento da Ictiofauna Marinha e Estuarina - SEI 0502135, complementado pela Nota Técnica CTBio 03/2017), previsto para cinco anos. Desta forma, serão coletados dados biológicos para os estudos da ictiofauna estuarina/costeira (incluindo recifal) e carcinofauna estuarina/costeira, atingidos direta ou indiretamente em consequência da ruptura da barragem de Fundão (Mariana/MG). Os resultados preliminares descreverão as variações espaciais e temporais nos aspectos populacionais, da comunidade e das relações destas com as variáveis ambientais, após o desastre. Serão estudados os peixes e crustáceos atingidos diretamente pelo desastre, no estuário do rio Doce (macroescala, 10km de distância entre cada ponto amostral). Visando determinar o espectro da biota atingida indiretamente pelo impacto, serão estudadas a ictiofauna e carcinofauna dos estuários dos rios Ipiranga, São Mateus (norte do Espírito Santo) e Caravelas (RESEX Cassurubá, sul da Bahia) (os três em mesoescala, 2km entre os pontos amostrais) e áreas marinhas adjacentes. Ainda, será monitorada a ictiofauna dos ambientes recifais adjacentes aos estuários estudados, e também aquela dos recifes situados na APA Costa das Algas (sul do Espírito Santo). As populações de peixes e crustáceos serão descritas quanto a ocorrência, abundância, biomassa e tamanho médio, enquanto as respectivas comunidades serão descritas através de riqueza de espécies, dominância e diversidade. Já o uso do habitat por espécies de peixes selecionadas será estudado através de telemetria, microquímica de otólitos, e fluxo de larvas/recrutas e adultos/juvenis entre os estuários e ambientes costeiros adjacentes. Ao final desta etapa, serão selecionadas espécies (mais abundantes e/ou de importância comercial) para os estudos dirigidos de reprodução e ecologia trófica.

3. OBJETIVO

Coletar dados para a descrição preliminar (ano um) dos aspectos populacionais (abundância, biomassa e tamanho), da comunidade e uso de habitat, dos peixes e crustáceos estuarinos/costeiros (incluindo peixes recifais) afetados direta (rio Doce e adjacências) ou indiretamente (rios Caravelas, São Mateus e Ipiranga, e adjacências) pelos rejeitos de minério resultantes do rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG).

4. METAS E JUSTIFICATIVAS

Meta 1- Ecologia trófica da ictiofauna

A constância de ocorrência, a abundância relativa (em número e peso) e o comprimento dos peixes capturados nos estuários do rio Doce (pequena escala) e Piraquê-açu serão descritos, para fundamentar a seleção das espécies a serem monitoradas quanto à dieta e ecologia trófica.

Meta 1.1- Coletas de amostras da ictiofauna com rede de arrasto, em 12 pontos (6 pontos em cada estuário, em pequena escala) nos estuários do rio Doce (Regência) e Piraquê-açu;

Meta 1.2- Triagem, identificação e biometria (comprimento, peso) da ictiofauna coletada nos estuários do rio Doce (pequena escala) e Piraquê-açu coletados durante 13 meses;

Meta 1.3 - Organização de banco de dados de ictiofauna: digitar e organizar os dados coletados e triados durante 13 meses;

Meta 1.4- Análises da estrutura de populações de peixes estuarinos/marinhos: calcular a constância de ocorrência, a abundância relativa (em número e peso) e descrever o comprimento das espécies capturadas nos estuários do rio Doce (pequena escala) e Piraquê-açu; Selecionar as espécies para análises posteriores da dieta e ecologia trófica;

Meta 1.5- Preparação de indivíduos coletados para deposição em uma Coleção Ictiológica.

Meta 2- Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos

Serão descritas ocorrência, abundância, biomassa e tamanho dos indivíduos, além de calcular os descritores da ictiofauna (riqueza, diversidade e dominância). Para cada estuário (rio Doce, em macroescala, e estuários ao norte), serão elaboradas tabelas por mês e ponto, da seguinte forma:

Meta 2.1- Coleta de peixes e crustáceos nos quatro estuários por 12 meses, realizada através de 48 expedições;

Meta 2.2- processar os peixes coletados durante 13 meses;

Meta 2.3- digitar os dados coletados e processados durante 13 meses.

Meta 3 - Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais

Será estimada a diversidade genética, frequência e número de alelos efetivos e provados, heterozigosidade observada e esperada para as espécies estudadas coletas na região no rio Doce (macroescala), estuários ao norte deste e suas áreas adjacentes. Além disso, serão realizados estudos genéticos envolvendo DNA mitocondrial (Barcoding) para as espécies de peixes coletadas, visando a composição de um banco de DNA das espécies da região.

Meta 3.1- Genética de populações de peixes: ao longo de um ano serão coletadas amostras em cada localidade estudada seguindo um gradiente de impacto a partir do rio Doce (totalizando mínimo 10 indivíduos de cada espécie) para um estudo de genética de populações para as 15 espécies de peixes selecionadas segundo sua abundância e disponibilidade;

Meta 3.2- microssatélites: DNA das amostras será extraído e enviado para que marcadores moleculares microssatélites sejam desenvolvidos para as espécies selecionadas;

Meta 3.3- DNA mitocondrial (Barcoding): coleta de amostras de cinco indivíduos de cada espécie de peixe para as análises durante o período de estudo.

Meta 4- Estudos de microquímica de otólitos peixes estuarinos/marinhos, no estuário do rio Doce e área marinha adjacente

Meta 4.1- coleta de 300 exemplares de peixes estuarinos/marinhos de espécies de importância comercial, abundantes e frequentes;

Meta 4.2- processamento preliminar de otólitos dos exemplares coletados durante o período;

Meta 5 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais

Serão realizados censos visuais subaquáticos com o objetivo de descrever ocorrência e abundância, e estimar tamanho dos peixes recifais, além de calcular os descritores da ictiofauna (riqueza, diversidade e dominância), através de censo visual.

Meta 5.1- realizar 05 expedições de mergulho para censos visuais, sendo uma em cada uma das áreas de estudo presentes no TR: RESEX Cassurubá (recifes de Sebastião Gomes, Nova Viçosa, Coroa Vermelha e parcel das Paredes), Parque Nacional Marinho dos Abrolhos e APA Costa das Algas;

Meta 5.2- análises de imagens (vídeos, fotografias) e processamento de dados de censos visuais;

Meta 5.3- realizar duas expedições para coleta de larvas de peixes com armadilhas de luz em cada uma das 05 áreas de estudos de peixes recifais;

Meta 5.4- processamento e análise das amostras provenientes das armadilhas de luz e cálculo dos descritores da comunidade (cálculo de CPUE por armadilha, cálculo do índice de diversidade de Shannon-

Wiener, Análise de Variância entre a CPUE e diversidade de espécies capturadas pelas armadilhas de luz para o fator localidade amostrada);

Meta 5.5- correlacionar os dados obtidos com a armadilha de luz, acerca do aporte larvário com os dados de juvenis obtidos pelos censos visuais para entender os padrões de recrutamento na área impactada;

Meta 6- Estudos de telemetria de peixes no estuário do rio Doce

Será realizado o monitoramento contínuo do uso de habitat e deslocamentos, de espécies de peixes de importância comercial no estuário do rio Doce e área marinha adjacente, utilizando telemetria acústica.

Meta 6.1- estabelecer o sistema de rastreamento e implantar transmissores acústicos em 60 exemplares de peixes de duas espécies, de preferência aquelas de interesse comercial;

Meta 6.2- localizar a distribuição de áreas de forrageio e deslocamentos da espécie alvo do monitoramento;

Meta 6.3- identificar e acompanhar a influência da variação mensal dos processos físicos e químicos sobre a distribuição dos exemplares monitorados na região impactada;

Meta 6.4- obter dados para a futura descrição das síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 6.5- determinar síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 7- Estudos de telemetria de peixes recifais

Será realizado o monitoramento contínuo do uso de habitat e deslocamentos, de espécies de peixes de importância comercial nos ambientes recifais adjacentes ao rio Doce, utilizando telemetria acústica.

Meta 7.1- estabelecer o sistema de rastreamento e implantar transmissores acústicos em 60 exemplares de peixes de duas espécies, de preferência aquelas de interesse comercial;

Meta 7.2- localizar a distribuição de áreas de forrageio e deslocamentos da espécie alvo do monitoramento;

Meta 7.3- identificar e acompanhar a influência da variação mensal dos processos físicos e químicos sobre a distribuição dos exemplares monitorados na região impactada;

Meta 7.4- obter dados para a futura descrição das síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 7.5- determinar síndromes de comportamento devido às influências de variações nos processos físico-químicos que afetam a distribuição de os exemplares monitorados na região impactada.

Meta 8- Relatórios técnicos

Meta 8.1- 01 relatório técnico semestral no mês 09;

Meta 8.2- 01 relatório técnico anual no mês 15.

5. PRODUTOS

5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i> (continua)
Meta 1: - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de peixe por estuário estudado (Doce em pequena escala e Piraquê-açú;	Prof. Jean Joyeux
Meta 2: - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de peixe por estuário estudado;	Prof. Maurício Hostim
Meta 2: - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de crustáceo por estuário estudado;	Prof. Julien Chiquieri
Meta 3.1: - número de amostras coletadas das 15 espécies de peixes selecionadas; - número de extrações efetuadas; - número de loci de microssatélites desenvolvidos e otimizados para cada espécie;	Profª Fabiana César Félix-Hackradt

<p>Meta 3.2:</p> <ul style="list-style-type: none"> - número e nome das espécies identificadas molecularmente; - número de sequências <i>barcoding</i> geradas para o período de 12 meses para cada espécie; 	<p>Prof^a Ana Paula Cazerta Farro</p>
---	---

<p>5.1. DADOS BRUTOS <i>(Listar os dados que serão entregues como produto, segundo o TR4, tanto os coletados in situ como os processados no laboratório)</i></p>	<p>RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i> (conclusão)</p>
<p>Meta 4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - número de otólitos de peixes estuarinos/marinhos de importância comercial coletados, por espécie; - número de otólitos cortados, fixados e preparados em lâminas para análise; - dados das análises microquímicas dos otólitos; 	<p>Prof. Felipe A. L. M. Daros</p>
<p>Meta 5:</p> <ul style="list-style-type: none"> - abundância, biomassa e amplitude de tamanho de cada espécie de peixe recifal; - distribuição espacial das espécies de peixes recifais (larvas e juvenis/adultos); 	<p>Prof. Carlos Werner Hackradt e Prof^a Fabiana Cézar Félix-Hackradt</p>
<p>Meta 6:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pontos georreferenciados da localização de duas espécies de peixes estuarino/marinhos - movimentação (distância máxima linear e polígono convexo máximo) de duas espécies de peixes estuarinos/marinhos 	<p>Prof. Maurício Hostim e Prof. Carlos Werner Hackradt</p>
<p>Meta 7:</p> <ul style="list-style-type: none"> - pontos georreferenciados da localização de duas espécies de peixes recifais - movimentação (distância máxima linear e polígono convexo máximo) de duas espécies de peixes recifais 	<p>Profs. Maurício Hostim e Carlos Werner Hackradt</p>

<p>5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i></p>	<p>RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i> (continua)</p>
<p>Meta 1:</p> <ul style="list-style-type: none"> - variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes estuarinos/marinhos por estuário estudado (Doce em pequena escala e Piraquê-açú; 	<p>Prof. Jean Joyeux</p>
<p>Meta 2:</p> <ul style="list-style-type: none"> - variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes estuarinos/marinhos; - variações espaciais e temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de crustáceos estuarinos/marinhos; 	<p>Prof. Maurício Hostim e Prof. Julien Chiquieri</p>
<p>Meta 3.1</p> <ul style="list-style-type: none"> - otimização dos protocolos de extração; - otimização dos microsatélites para as 15 espécies selecionadas; 	<p>Prof^a Fabiana Cézar Félix-Hackradt</p>
<p>Meta 3.2</p> <ul style="list-style-type: none"> - resultados da identificação das espécies via DNA mitocondrial (<i>Barcoding</i>) de 05 indivíduos por espécie de peixe capturada do mês 01 ao mês 10; 	<p>Prof^a Ana Paula Cazerta Farro</p>
<p>Meta 4:</p> <ul style="list-style-type: none"> - análise do perfil Sr:Ca entre o núcleo e a borda dos otólitos; - assinatura química do núcleo e da borda dos otólitos; 	<p>Prof. Felipe A. L. M. Daros</p>

5.2. ANÁLISE DE DADOS <i>(Relacionar as análises que serão feitas e entregues até o 15º mês de vigência do Projeto)</i>	RESPONSÁVEL <i>(Pessoal Vinculado)</i> (conclusão)
Meta 5: - variações espaço-temporais nos parâmetros populacionais e da comunidade de peixes recifais acessada pela análise de variância desbalanceada (Beyond-BACI); - variações espaço-temporais nos padrões de assentamento de larvas e recrutamento de juvenis acessada pela análise de variância desbalanceada (Beyond-BACI);	Prof. Carlos Werner Hackradt e Prof ^a Fabiana César Félix-Hackradt
Meta 6: - estimativa da área de vida de duas espécie de peixes recifais, calculadas à partir do método de Kernel "Kernel Utilization Density" para KUD50% e KUD95%; - comparação das áreas de vida entre habitats e a área impactada e área controle por modelos lineares generalizados; - mapas de distribuição de áreas de vidas e modelos selecionados (seleção através de Akaike Information Criteria) entre os locais impactado e controle;	Prof. Maurício Hostim e Prof. Carlos Werner Hackradt
Meta 7: - estimativa da área de vida de duas espécie de peixes recifais, calculadas à partir do método de Kernel "Kernel Utilization Density" para KUD50% e KUD95%; - comparação das áreas de vida entre habitats e a área impactada e área controle por modelos lineares generalizados; - mapas de distribuição de áreas de vidas e modelos selecionados (seleção através de Akaike Information Criteria) entre os locais impactado e controle;	Prof. Maurício Hostim e Prof. Carlos Werner Hackradt

As análises finais serão feitas comparando os resultados do primeiro ano com dados pretéritos existentes.

6. METODOLOGIA

6.1 Área de estudo

Coletas mensais serão realizadas para estudo da ictiofauna e carcinofauna na foz do rio Doce (Linhares/ES), área diretamente impactada pelo rompimento da barragem de Fundão (Mariana/MG), e sua área marinha adjacente. Além deste, visando o monitoramento de um gradiente das áreas indiretamente atingidas pelo desastre, serão estudados os estuários dos rios Ipiranga, São Mateus e Caravelas (BA), e suas áreas marinhas adjacentes (conforme pontos determinados no TR). Em cada área (rio e área adjacente) serão amostrados nove pontos distantes 2km entre si, exceto no rio Doce, que será amostrado em macroescala (9km de distância entre os pontos amostrais).

Expedições semestrais (item 3.1.5 anexo 7-TR4) serão realizadas para cinco áreas recifais, a distâncias crescentes da foz do rio Doce, das quais estão incluídas a 1 - APA da Costa das Algas, os recifes do Espírito Santo (em frente à foz do rio São Mateus), a 3 RESEX de Cassurubá (3.1 - recifes de Sebastião Gomes, 3.2 - Nova Viçosa e 3.3 - Coroa Vermelha, além de 4 - parcel das Paredes) e o 5 - Parque Nacional Marinho de Abrolhos, além dos recifes e concreções rochosas da costa, como controles entre as demais localidades. Em cada localidade serão avaliados seis setores aleatórios nos quais serão realizados seis censos visuais subaquáticos para avaliação da comunidade de peixes recifais adultos e outros seis específicos para avaliação de recrutas e juvenis de peixes recifais. Nas mesmas localidades serão realizadas saídas específicas para colocação de armadilhas de luz que serão utilizadas para captura de larvas de peixes marinhos. Além disso, duas destas áreas, Parque Nacional Marinho de Abrolhos e recifes do Espírito Santo (localizados em frente à foz do rio São Mateus), serão utilizados para os estudos de movimentação e telemetria.

6.2 Procedimentos de campo e laboratório

* Meta 1 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos (Doce em pequena escala e Piraquê)

Para as coletas padronizadas de peixes, em cada campanha, em cada ponto, serão realizados três

arrastos de cinco minutos cada, utilizando-se redes de arrasto de fundo com portas (semelhantes àquelas empregadas na pesca do camarão da região estudada), operada por embarcação de médio porte, adequada ao esforço, às condições ambientais e aos objetivos. Em cada arrasto, serão anotadas coordenadas geográficas (com auxílio de GPS), e ainda, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e transparência (de fundo e superfície), com auxílio de uma sonda multiparâmetros. Peixes coletados serão acondicionados em sacos plásticos identificados quanto ao arrasto, ponto e data de coleta, e acondicionados em gelo para transporte ao laboratório, onde permanecerão armazenados em congelador até o momento da triagem em laboratório.

No laboratório (triagem), os peixes serão identificados até o menor nível taxonômico possível, medidos (comprimentos padrão e total - CP e CT) em milímetros com ictiômetro, e pesados (o mais próximo de 0,01g) com balança.

Após os procedimentos de laboratório, alguns exemplares de cada espécie de peixes e crustáceos serão selecionados para serem preservados para eventual tombamento em coleção zoológica, até que se tenha representantes de todas as espécies amostradas.

* Meta 2 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos

Para as coletas padronizadas de peixes e crustáceos, em cada campanha, em cada ponto, serão realizados três arrastos de cinco minutos cada, utilizando-se redes de arrasto de fundo com portas (semelhantes àquelas empregadas na pesca do camarão da região estudada), operada por embarcação de médio porte, adequada ao esforço, às condições ambientais e aos objetivos. Em cada arrasto, serão anotadas coordenadas geográficas (com auxílio de GPS), e ainda, pH, temperatura, oxigênio dissolvido e transparência (de fundo e superfície), com auxílio de uma sonda multiparâmetros. Peixes e crustáceos coletados serão acondicionados em sacos plásticos identificados quanto ao arrasto, ponto e data de coleta, e acondicionados em gelo para transporte ao laboratório, onde permanecerão armazenados em congelador até o momento da triagem em laboratório.

No laboratório (triagem), os peixes serão identificados até o menor nível taxonômico possível, fotografados, medidos (comprimentos padrão e total - CP e CT) em milímetros com ictiômetro, e pesados (o mais próximo de 0,01g) com balança. Já os crustáceos acompanhantes serão fotografados, identificados no menor nível taxonômico possível, medidos (com paquímetro digital) quanto ao CT e Comprimento da Carapaça (CC) em mm, e pesados (g), com auxílio de balança (precisão 0,01g).

Após os procedimentos de laboratório, alguns exemplares de cada espécie de peixes e crustáceos serão selecionados para tombamento em coleção zoológica, até que se tenha representantes de todas as espécies amostradas.

* Meta 3 - Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais

Meta 3.1 - genética de populações de peixes:

Para a análise da genética de populações de pelo menos 15 espécies de peixes, após a triagem, serão retiradas porções das nadadeiras de, pelo menos 10 exemplares (adultos e/ou juvenis) de cada espécie, ao longo de todo o período estudado. Estas serão conservadas e armazenadas congeladas em frascos plásticos contendo álcool PA, até que sejam processadas.

As extrações de DNA a partir dos tecidos da nadadeira serão feitas segundo o protocolo de Sambrook *et al.* (1989) no qual o tecido é adicionado a uma solução tampão de lise e proteinase K para sua digestão. Posteriormente o DNA será isolado através da precipitação proteica e as impurezas eliminadas com etanol. O DNA será quantificado e terá determinada sua qualidade através de espectrofotômetro de ácidos nucleicos e proteínas.

Três tipos de marcadores moleculares serão utilizados para as análises genéticas. Inicialmente, os marcadores deverão ser desenvolvidos e otimizados para cada espécie. Assim, primeiramente necessitaremos que: i) microssatélites sejam confeccionados especificamente para as espécies de interesse; além do uso adicional de ii) marcadores mitocondriais; e iii) regiões nucleares que serão utilizadas para os estudos de genética populacional. Um mínimo de 10 *loci* deverão ser selecionados para as ampliações do material genético usando marcadores microssatélites.

Meta 3.2 - DNA mitocondrial (*Barcoding*):

Para os estudos de DNA mitocondrial *Barcoding*, porções dos músculos e/ou nadadeiras de 5 exemplares (quando possível) de cada espécie serão removidas, armazenadas em frascos plásticos com álcool 96%, e mantidas congeladas até o processamento. Este procedimento será realizado para todas as espécies coletadas.

Para a análise de DNA mitocondrial *barcoding*, serão sequenciados segmentos parciais do gene mitocondrial COI para cinco indivíduos de todas as espécies coletadas em cada um dos locais de coleta ao

longo do período do monitoramento. Para a amplificação e sequenciamento dos serão utilizados os primers descritos por Ward *et al.* (2005). As sequências obtidas serão submetidas ao banco de dados BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2013) (<http://www.boldsystems.org/>), para verificar a correspondência e similaridade com as sequências armazenadas no banco de dados.

*** Meta 4 - Estudos de microquímica de otólitos peixes estuarinos/marinhos**

Exemplares adultos das espécies selecionadas serão coletados nos quatro estuários, entre a região de água doce e a região marinha utilizando diferentes artes de pesca, sendo 75 indivíduos por estuário (total de 300 amostras). Após a captura os exemplares serão acondicionados em caixa térmica e levados para laboratório, onde serão medidos (comprimento padrão em centímetros), pesados (gramas), e dissecados para a retirada dos otólitos, que serão removidos cuidadosamente com pinças plásticas para evitar contaminação metálica, limpos de tecidos orgânicos e armazenados em tubos Eppendorf.

As análises químicas elementares serão realizadas para diferentes fases do ciclo de vida dos peixes (do nascimento até a data da coleta), visando compreender o uso das regiões estuarinas contempladas no monitoramento ao longo da vida da espécie. As análises químicas serão realizadas por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivo por ablação a laser (ICP-MS-LA). Os otólitos serão limpos dos tecidos orgânicos aderentes, lavados com água ultrapura, secos ao ar e montados em resina epóxi. Posteriormente serão cortados em seções delgadas (200-300 µm). As seções serão posteriormente desbastadas com lixas de carboneto de silício até o plano do núcleo, com a ajuda de um microscópio metalográfico. Serão finalmente polidas com pastas de diamantes e montadas em lâmina de vidro convencional com uma gota de resina epóxi. Após secagem e polimerização da resina, as lâminas serão descontaminadas com água ultrapura durante 3 minutos em ultrassom, lavadas abundantemente com água ultrapura e deixadas secar numa câmara de fluxo laminar. Serão obtidas as leituras de um conjunto de isótopos usualmente informativos nos otólitos (e.g. ⁷Li, ²⁵Mg, ⁵⁵Mn, ⁶⁵Cu, ⁶⁶Zn, ⁸⁸Sr, ⁸⁵Rb, ¹³⁸Ba, ⁵⁶Fe e ²⁰⁸Pb) conjuntamente com o cálcio (⁴³Ca), que funciona como um padrão interno. A dimensão do feixe laser será em função da microestrutura dos otólitos e será ajustado com base em análises preliminares. A razão Sr:Ca, indicativa de uso do habitat, será analisada através de um transecto entre o núcleo e a borda do otólito, já a assinatura química, que permitirá diferenciar quimicamente os estuários, irá analisar preferencialmente o núcleo e a borda dos otólitos, que nos dá informação sobre a fase natal (postura, eclosão larval ou berçário) ou de captura do indivíduo, respectivamente.

*** Meta 5 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais**

Para o monitoramento da ictiofauna recifal as áreas amostradas serão classificadas segundo a sua distância da foz do rio Doce, utilizando um desenho de impacto ambiental Beyond-BACI. A avaliação será feita semestralmente, em múltiplas áreas controles e áreas impactadas nas cinco áreas recifais adjacentes ao rio Doce, cuja distância da foz é a menor. Em cada área, seis setores aleatórios serão selecionados, nos quais seis censos visuais serão realizados em cada setor, tendo como unidade amostral os censos visuais. Nestas áreas, o recrutamento de peixes será monitorado por censos específicos para juvenis, em um total de seis censos por área, enquanto o aporte larval será descrito através do emprego de armadilhas de luz, para estimar a chegada de pós-larvas aos ambientes recifais adjacentes às desembocaduras dos rios. Uma vez coletadas e armazenadas em álcool 70%, as larvas serão avaliadas com o uso de um estereoscópio para sua identificação e fotodocumentação para fins de registro visual das espécies amostradas.

Para os censos visuais, a abundância e a estrutura de tamanho dos peixes serão estimadas e as espécies identificadas por mergulhadores treinados e calibrados para as estimativas de tamanho. A abundância será ser registrada em classes, com base em uma escala logarítmica (de base 2) e a estimativa de tamanho em classes de 2 em 2cm.

Metas 6 e 7 - Estudos de telemetria de peixes no estuário do rio Doce e recifes adjacentes

A base do sistema de rastreamento é composta por emissores acústicos e receptores. Os primeiros são pequenos e autossuficientes, não perturbam os movimentos naturais do animal e emitem sinais acústicos singulares e identificáveis, através de frequências de emissão únicas ou pela emissão de pings acústicos codificados. Os receptores, colocados em malhas amostrais ao longo da rota de movimentação dos peixes, registram o sinal acústico. Outras informações ambientais relevantes podem ser adquiridas através de métodos acessórios como coleta de dado *in loco*, imagens de satélites ou observação direta. Transmissores codificados e contínuos, de tecnologia VEMCO serão utilizados em conjunto com receptores submersíveis fixos, modelo VR2W e receptores móveis, modelo VR100. Os transmissores são embalados em cilindros com 9 mm diâmetros, que contém componentes eletrônicos e bateria selada em epóxi para resistir a submersão e a alta pressão. Os receptores VR2W têm canal único com tecnologia Bluetooth® wireless, capazes de identificar os sinais codificados dos transmissores VEMCO. O VR100, vêm acoplado com dois hidrofones, um direcional e um holodirecional, oito canais configuráveis de recepção acústica e são capazes

de interpretar a emissão dos transmissores contínuos ou codificados.

Para os peixes estuarinos/marinhos serão instaladas duas malhas de receptores. O primeiro estará localizado ao longo do estuário do rio Doce e o segundo na região marinha adjacente. Cada conjunto de receptores será composto por 20 receptores fixos VR2W. Os transmissores acústicos serão implantados na cavidade celomática dos peixes, seguindo protocolo já desenvolvido (Hackradt C.W. observação pessoal). A manutenção dos receptores e leitura dos dados será realizada trimestralmente durante o período de monitoramento. Entretanto, varreduras mensais, em áreas de sombra ou descobertas pela malha de receptores serão realizadas com auxílio do VR100 e da telemetria ativa para maior acurácia dos dados obtidos.

Para os peixes recifais, será empregada a mesma metodologia de malha de receptores em duas áreas, no Parque Nacional Marinho de Abrolhos (área controle) e nos recifes do Espírito Santo (aqueles localizados em frente à foz do rio São Mateus; área potencialmente impactada). Cada conjunto de receptores será composto por 30 receptores fixos VR2W. Os transmissores acústicos serão implantados na cavidade celomática dos peixes, seguindo protocolo já desenvolvido (Hackradt C.W. observação pessoal). A manutenção dos receptores e leitura dos dados será realizada trimestralmente durante o período de monitoramento. Na mesma oportunidade do monitoramento, dados complementares serão tomados a partir da telemetria ativa com uso do VR100 para melhor acurácia dos dados.

6.3 Análises de dados

* Meta 2 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes estuarinos/marinhos

Será construída a curva do coletor, utilizando-se modelos de ajuste da curva para estimativas da riqueza total, como Jackknife 1 e 2, Chao 1 e 2, ACE e ICE, e Bootstrap (Colwell & Coddington, 1994), para peixes e crustáceos separadamente.

Para peixes e crustáceos, em separado, serão calculados a abundância relativa (%) dos exemplares por espécie (número e peso), e os descritores das assembleias como o índice de Diversidade de Shannon-Wiener, Equitatividade, Constância de ocorrência (C) das espécies, índices de Morisita-Horn e Jaccard, e o de Dominância.

Abundância, biomassa e os descritores da assembleia serão testados por PERMANOVA (Anderson *et al.*, 2008), considerando como fatores fixos mês, estação do ano e pontos por estuário. A análise será baseada em uma matriz de similaridade de Bray-Curtis com 9999 permutações.

Para a descrição das assembleias de peixes e crustáceos, separadamente, visando o ordenamento de pontos segundo a distribuição das espécies, será utilizada a análise de cluster hierárquico (modo normal) utilizando-se para isto, as espécies que representarão no mínimo 1% da abundância numérica (transformada em $\log(x+1)$) de cada estuário. A matriz de similaridade será gerada a partir do índice de similaridade de Bray-Curtis (Ludwig & Reynolds, 1988).

Os dados relativos aos fatores ambientais (salinidade e temperatura) serão submetidos a um modelo de ANOVA fixa.

* Meta 3 - Estudos de genética de peixes estuarinos/marinhos e recifais

* Meta 3.1 - Genética de populações de peixes

Ao final do período de 16 meses será otimizado o protocolo de extração de DNA para as amostras originárias de 15 espécies de peixes, além de quantificar o DNA em cada amostra. Assim, as melhores amostras servirão de modelo para o desenvolvimento de *locus* de microssatélite que serão otimizados para as espécies em estudo.

Meta 3.2 - DNA mitocondrial (*Barcoding*):

A identificação de Barcode gap e o "*Barcode Index Number*" (Ratnasingham & Hebert, 2013) serão conduzidas por meio do site do *Barcoding of Life* (<http://www.barcodeoflife.org/>). Adicionalmente será desenvolvida uma biblioteca de DNA *barcodes* para as espécies nativas da região que ainda não possuem a sequência registrada. As sequências obtidas serão depositadas no banco de dados, de forma a serem reconhecidas formalmente como sequências *barcode* das espécies em questão. Para tanto, conterão o nome da espécie, o voucher com os dados de catalogação e instituição de depósito (dados de coleta: nome dos coletores, data e localização com coordenadas geográficas), nome do especialista que identificou a espécie, a sequência da região barcode com pelo menos 500 pb, informações sobre os primers utilizados na amplificação do fragmento de DNA e os respectivos eletroferogramas gerados de ambas as fitas de DNA (Ratnasingham & Hebert, 2007).

*** Meta 4 - Estudos de microquímica de otólitos peixes estuarinos/marinhos**

Para avaliação do uso do habitat através da microquímica do otólito, os dados do perfil da razão Sr:Ca entre o núcleo e a borda do otólito serão comparadas utilizando o pacote *changeoint* (Killick *et al.*, 2016). Diferenças entre comprimento padrão, idade e razões Sr:Ca no centro e nas bordas do otólito serão avaliadas utilizando testes t, se necessário serão transformados para atender os pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias (Daros *et al.*, 2016a). A detecção e transformação (i.e. substituição pelo valor extremo mais próximo) de “outliers” será realizada com recurso ao teste de Grubbs. Serão efetuadas análises uni e multivariadas para testar as assinaturas químicas singulares e múltiplas, respetivamente. Será realizada uma análise de variância unifatorial (ANOVA) (fatores: localização ou data captura) seguido, se necessário, por testes à posteriori (teste de Tukey). Análises multivariadas de variância (MANOVA) será também usada para testar diferenças espaciais (e eventualmente temporais) nas assinaturas químicas elementares. Na MANOVA será reportado o parâmetro estatístico Pillai's trace. Comparações post-hoc serão feitas mediante testes de Hotelling T-square. Análises discriminantes lineares (L DFA) ou quadráticas (Q DFA) serão usadas para visualizar e discriminar as diferenças espaciais entre grupos. Matrizes de jackknife serão utilizadas para aferir o sucesso de re-classificação (%) dos indivíduos ao local de captura (Daros *et al.*, 2016b) Todas as análises estatísticas serão realizadas em ambiente R (R Core Team, 2016). Será utilizado o nível de significância de $p < 0,05$ e os dados serão plotados como média \pm desvios padrão.

*** Meta 5 - Estudos de composição e estrutura de comunidades e populações de peixes recifais**

A avaliação do impacto sobre a abundância e estrutura das assembleias de peixes será realizada através de censos visuais subaquáticos conduzidos através de transecções seguindo um desenho Beyond-BACI (Underwood 1991, 1994).

O desenho amostral Beyond-BACI é do tipo assimétrico, pois não há o mesmo número de níveis para todos os fatores estudados. O fator fixo Impacto (I) apresenta 2 níveis, o primeiro Impacto (I), é o local impactado, próximo a foz do rio Doce e o segundo nível Controle (C) perfaz os locais amostrados longe da foz, mais distantes da área impactada; portanto se faz necessário a criação de um contraste entre os níveis do impacto para a correta avaliação deste fator (I vs. C). Dentro de cada nível do fator I serão estabelecidos seis Setores (S), fator aleatório com 6 níveis, utilizados com o fim de estabelecer réplicas espaciais para o fator estudado, no intuito de aumentar a variabilidade espacial e a potência do desenho aplicado. Em cada setor serão conduzidos seis censos visuais, que serão utilizadas para avaliar a abundância e estrutura da assembleia de peixes. Acoplados aos seis censos, serão realizados outros seis, com menor área amostral, para determinação das abundâncias de juvenis e recrutas das espécies de peixes recifais.

Conjuntamente a identificação da espécie, o observador estimará a abundância da mesma em classes de escala geométrica (cf. Harmelin, 1987; García-Charton & Pérez-Ruzafa, 2001; Hackradt *et al.*, 2011), o comprimento total dos indivíduos será estimado em classes de tamanho de 2 cm (i.e.: Hackradt *et al.*, 2011). Após terminado o percurso de ida, o observador estimará alguns dados abióticos: a) Heterogeneidade - Tipo de substrato (estimando visualmente a % de rocha, % de areia; % de cascalho); b) Cobertura (estimando visualmente % de coral, % de algas, % de Palythoa, % sem cobertura); c) Complexidade (contagem do: número de blocos pequenos, medianos e grandes; e estimativa visual da rugosidade (1 a 4, sendo 1 o terreno liso e 4 o mais arrugado e alto possível) e a inclinação do terreno (em escala visual: 0-30°, 30-60°, 60-90°) (cf.: Félix-Hackradt *et al.*, 2014), além de profundidade e temperatura da água. Estes parâmetros serão aplicados para controlar a variância entre os censos aplicados.

Os dados de abundância determinados pela CPUE de adultos, juvenis, recrutas e larvas, além de riqueza e diversidade, serão analisados através da análise de variância desbalanceada (ANOVA) (Underwood, 1997; Benedetti-Cecchi, 2001; Glasby, 1997). Diferenças na abundância das espécies de peixes, assim como riqueza específica e diversidade serão testadas frente os fatores de tratamento propostos. O fator fixo Impacto (I) será testado através da comparação de todos os locais controle frente ao local impactado, e também na avaliação dos contrastes de seus níveis - Impacto versus Controle (I vs. C) e dos locais Controle (C) entre si. Adicionalmente, o fator aleatório espacial Setor (S) será testado de forma aninhada ao fator Impacto [S(I)], assim como aos seus contrastes, buscando verificar a consistência do efeito do impacto em diferentes setores. Ele também será testado com seus respectivos contrastes, a fim de controlar a variabilidade ambiental existente a pequena escala.

Segundo Underwood (1997), o efeito do impacto sobre as variáveis resposta da comunidade recifal, será avaliado através da significância do fator impacto, e no contraste entre o impacto e os controles (I vs. C). Adicionalmente, o mesmo também poderá ser detectado, porém diferencialmente para cada setor estudado, através da significância da interação dos fatores S(I) ou S(I vs. C) (Underwood, 1994; Glasby, 1997; Benedetti-Cecchi, 2001).

Metas 6 e 7 - Estudos de telemetria de peixes no estuário do rio Doce e em ambientes recifais

A localização teórica do peixe marcado pode ser estabelecida através de dois métodos: aritmético e harmônico. Como segundo Simpfendorfer *et al.*, (2002) as diferenças entre as abordagens são desprezíveis, utilizaremos o algoritmo de Simpfendorfer a partir da abordagem aritmética. Este método não leva em consideração o raio de detecção dos receptores, porém a zona de amostragem deve estar coberta pela recepção, isto é dizer que os indivíduos detectados estarão constantemente circulando pela área do polígono formado. O cálculo considera que quanto mais um indivíduo se aproximar do receptor, mais será detectado e vice-versa.

Os registros referentes às posições de marcação e as posições teóricas e o tempo de permanência na área de cada animal marcado será confrontado e analisado sob diferentes escalas de tempo (ciclos diários, mensais, etc.) através de estatística básica, utilizando Qui-quadrado (χ^2) e teste t quando possível, para avaliar se há diferenças significativas entre os indivíduos. Estes registros darão base às estimativas de período de atividade, área de vida e área de dispersão individual.

Os dados de posicionamento, as detecções, serão utilizados para calcular a área de vida através de três métodos: polígono convexo mínimo (MCP) que estima a área com base em 100% das detecções; área de vida baseada na densidade de uso de Kernel a 95% (KUD95) e 50% (KUD50) das detecções. Para esta análise se utilizará a estimativa por "Least square cross-validation" que aumenta a resolução da área usada pelo peixe (Seaman & Powell, 1996). As análises serão conduzidas utilizando-se o pacote estatístico R (adehabit) e as análises espaciais utilizando quantum gis London (QGis v. 1.8).

Modelos lineares generalizados (GLM) serão aplicados com intuito de comparar a distância linear máxima percorrida e o tamanho da área de vida das espécies (todos os métodos) entre as áreas dentro e fora do rio (para espécies estuarino/marinhas) e impacto (recifes do Espírito Santo) e controle (ParNaMar Abrolhos) (para espécies recifais), considerando distintos habitats. Os GLMs são uma extensão dos modelos lineares normais, podendo incluir fatores aleatórios e covariáveis, assegurando flexibilidade estatística (Cordeiro & Demétrio, 2013). Os modelos que melhor explicam as relações de interesse, serão selecionados com base no Akaike Information Criteria (AIC), onde o menor peso (w_i) indica o modelo com melhor balanço entre ajuste e precisão (Burnham & Anderson, 2004).

Os dados de comportamento adquiridos a partir da telemetria acústica (padrão de movimentação em ciclos) será analisada para determinação de síndromes comportamentais nas espécies objeto de estudo. Estes dados serão analisados à luz dos modelos aditivos generalizados (GAM), levando em consideração o habitat e os fatores impacto e controle. O GAM é um modelo linear generalizado no qual o preditor linear depende de funções suaves desconhecidas de alguma(s) variável(is) preditora(s) (Hastie & Tibshirani, 1990). Por essa razão adequados para prever o como se dá o comportamento entre distintas situações de impacto e controle. Visto que parte dos parâmetros de suavização da curva são estimados como ajuste do modelo, o processo de suavização não remove um fator pouco explicativo. Para tal, aplicaremos o AIC como método de seleção dos parâmetros do melhor modelo explicativo, visto que é a técnica com melhor balanço entre ajuste e precisão (Burnham & Anderson, 2004).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, M. J.; Gorley, R. N. & Clarke, K. R. 2008. **PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods**. Plymouth, UK: PRIMER-E.
- Benedetti-Cecchi, L.; Pannacciulli, F.; Bulleri, F.; Moschella, P. S.; Airoidi, L.; Relini, G.; Cinelli, F.; 2001. Predicting the consequences of anthropogenic disturbance: large-scale effects of loss of canopy algae on rocky shores. **Marine Ecology Progress Series** v. 214, p. 137–150.
- Burnham, K. P.; Anderson, D. R. 2004. Multimodel inference: understanding AIC and BIC in model selection. **Sociological Methods & Research** v. 33, p. 261–304
- Colwell, R. K.; Coddington, J. A. 1994. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 345, n. 1311, p. 101-118.
- Cordeiro, G. M. & Demétrio, C. G. B. **Modelos lineares generalizados e extensões**. 483 p. Disponível em <http://www.esalq.usp.br/departamentos/lce/arquivos/aulas/2013/LCE5868/livro.pdf>
- Daros, F. A.; Spach, H. L.; Correia, A. T. 2016a. Habitat residency and movement patterns of *Centropomus parallelus* juveniles in a subtropical estuarine complex. **Journal of Fish Biology**, p. 1-15.

- Daros, F. A.; Spach, H. L.; Sial, A. N. & Correia, A. T. 2016b. Otolith fingerprints of the coral reef fish *Stegastes fuscus* in southeast Brazil: a useful tool for population and connectivity studies. **Regional Studies in Marine Science** v. 3, p. 262-272.
- García-Charton, J. A. & Pérez-Ruzafa, A. 2001. Spatial pattern and the habitat structure of a Mediterranean rocky reef fish local assemblage. **Marine Biology**, v. 138, p. 917-934
- Glasby, T. M. 1997. Analyzing data from post-impact studies using asymmetrical analyses of variance: a case study of epibiota on marinas. **Australian Journal of Ecology** v. 22, p. 448-459.
- Hackradt, C. W.; Félix-Hackradt, F. C.; García-Charton, J. A. 2011. Influence of habitat structure on fish assemblage of an artificial reef in southern Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 72, p.235-247.
- Harmelin, J. G. 1987. Structure et variabilité de l'ichtyofaune d'une zone rocheuse protégée en Méditerranée (Parc National de Port-Cros, France). P. S. Z. N. I. **Marine Ecology**, v. 8, n. 3, p.263-284.
- Hastie, T. J. & Tibshirani, R. J. **Generalized additive models**. Chapman and Hall, London, 1990. 335 p.
- Killick, R.; Haynes, K. & Eckley, I. A. 2016. *Changepoint: An R package for changepoint analysis*. R package version 2.2.2, <https://CRAN.R-project.org/package=changepoint>
- Ludwig, J. A. & Reynolds, J. F. **Statistical ecology**. [S. l.]: John Willey & Sons, 1988. 337 p.
- R Core Team. 2016. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ratnasingham, S.; Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: the Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 355–364.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2013. A DNA-based registry for all animal species: the Barcode Index Number (BIN) system. **PLoS ONE**, v. 8, e66213
- Sambrook, E.; Fritsch, F. & Maniatis, T. **Molecular Cloning**. Cold Spring Harbour press, New York, EEUU. 1989.
- Seaman, D. E. & Powell, R. A. 1996. An evaluation of the accuracy of kernel density estimators for home range analysis. **Ecology**, v. 77, p. 2075-2085.
- Simpfendorfer, C. A.; McAuley, C. R. & Unsworth, P. 2002. Validated age and growth of the dusky shark, *Carcharhinus obscurus*, from Western Australian waters. **Marine and Freshwater Research**, v. 53, p. 567-573.
- Underwood, A. J. 1991. Beyond BACI: Experimental designs for detecting human environmental impacts on temporal variations in natural populations, **Australian Journal of Marine and Freshwater Research** v. 42, p. 569 - 587.
- Underwood, A. J. 1994. On beyond BACI: sampling designs that might reliably detect environmental disturbances, **Ecological Applications** v. 4, p. 3 – 15.
- Underwood, A. J. **Experiments in ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance**. Cambridge: Cambridge University Press, 1997, 504 p.
- Ward, R. D.; Zemplak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R. & Hebert, P. D. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360 n. 1462, p. 1847-1857.
-
-