

**TERMO DE REFERÊNCIA 4**  
**PROGRAMA DE MONITORAMENTO DA BIODIVERSIDADE AQUÁTICA**

**ANEXO 2 - ESTUDO E MONITORAMENTO DO AMBIENTE DULCÍCOLA DA**  
**ÁREA AMBIENTAL I**

**1. CONTEXTO:**

No primeiro ano do monitoramento deverá ser realizado um diagnóstico ambiental amplo da área Ambiental I, conforme orientações estabelecidas no documento “Protocolo para estudos de ictiofauna”, apresentado pelo IBAMA na notificação nº678311, série E, processo 02009.001478/2015-97. A partir do segundo ano, o monitoramento deverá ser realizado conforme as orientações descritas a seguir.

**2. ÁREA DE ESTUDO**

As coletas deverão ser realizadas ao longo dos rios Gualaxo do Norte, Carmo e Doce e tributários, na ÁREA AMBIENTAL 1, em ambientes afetados e não afetados, conforme mapa (figura 1). Deverão ser contemplados todos os habitats presentes no ambiente aquático, tais como: canal principal e secundários do rio, incluindo suas margens, áreas de inundação marginais (várzea, lagoas marginais, lagoas intermitentes), cachoeiras, corredeiras, remansos, praias, trechos rochosos e ilhas; além dos tributários principais.

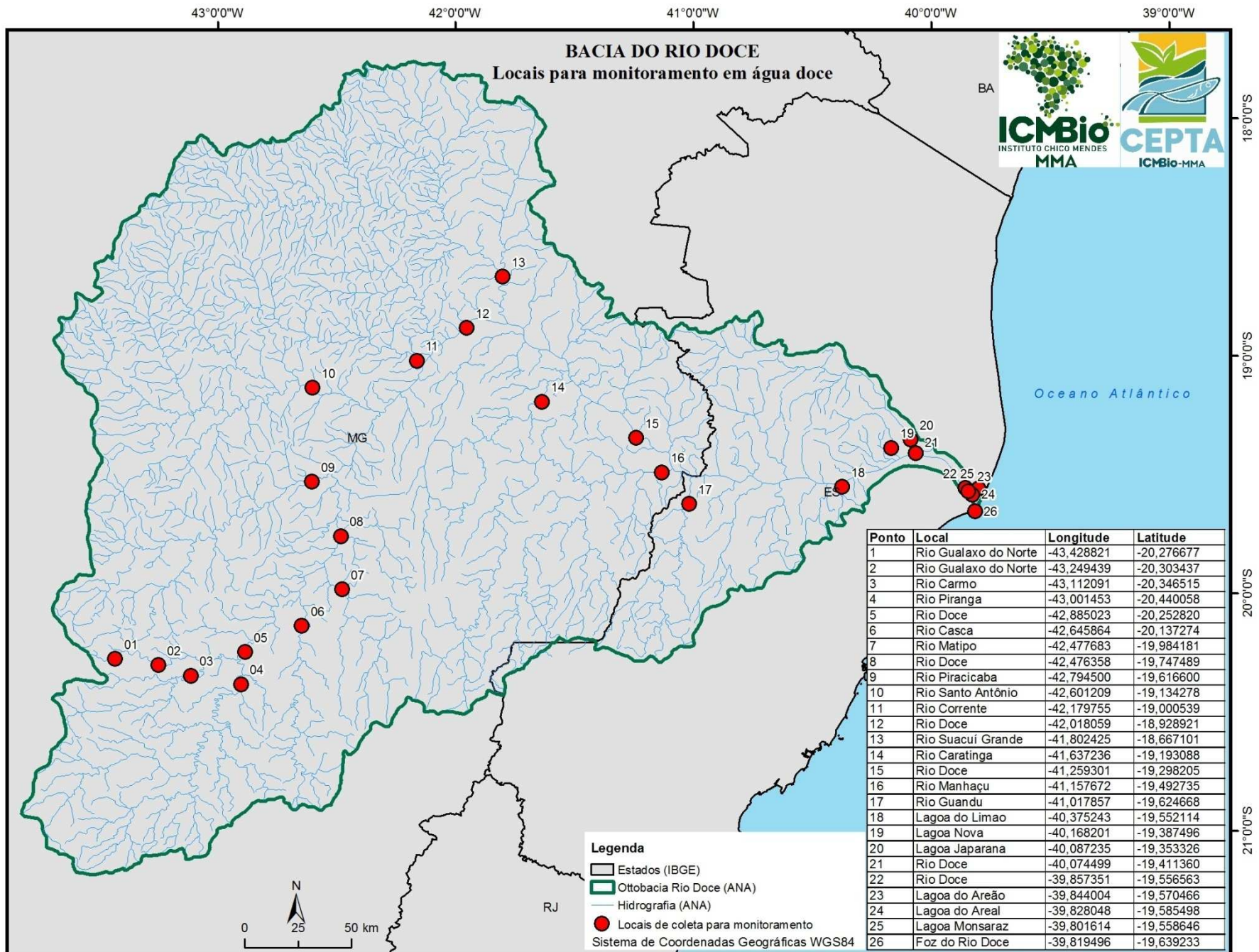


Figura 1. Pontos de coleta na Bacia do Rio Doce

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Ictiofauna

As coletas de ictiofauna deverão ser trimestrais em todos os pontos amostrais indicados na Figura 1.

Todos os locais de coleta, assim como todas as espécies coletadas, deverão ser fotografados e georreferenciados, gerando banco de dados e de imagens fotográficas digitais. Para todos os locais de coleta, deverá ser preenchida ficha padrão, conforme Anexo 2.2.

As coletas deverão ser executadas utilizando-se diversas artes e petrechos de pesca, conforme tabela 1, ou outros julgados necessários para a efetiva amostragem, considerando as características biológicas e ecológicas das diferentes espécies, com esforço padronizado. As redes de emalhe deverão ser instaladas sempre a partir das 16h00min e retiradas na manhã do dia seguinte a partir das 08h00min e inspecionadas em intervalos de quatro horas.

Deverão ser amostrados trechos mínimos de 150 metros, sendo recomendável a divisão em sessões de 50 metros e individualização das amostras coletadas. Os peixes coletados deverão ser armazenados separadamente de acordo com cada sessão, sendo os dados de riqueza e abundância também, apresentados separadamente.

Todos os indivíduos deverão ser identificados ao nível de espécies, e eventuais espécies de difícil identificação deverão ser encaminhadas a especialistas.

Tabela 1. Relação de petrechos de pesca a serem empregados nos estudos populacionais.

---

#### **Petrechos**

---

Rede de pesca malha 2, fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 4, fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 6 fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 8, fio 0,30 mm, 1,5 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 10, fio 0,35 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 12, fio 0,35 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 14, fio 0,40 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento
Rede de pesca malha 16, fio 0,40 mm, 2 m de altura x 20 m de comprimento
Tarrafa malha 2, fio 0,20 mm, 1,8 m de altura
Tarrafa malha 4, fio 0,40 mm, 2 m de altura
Tarrafa malha 6, fio 0,40 mm, 2 m de altura
Tarrafa malha 10, fio 0,50 mm, 4 m de altura
Tarrafa malha 12, fio 0,50 mm, 4 m de altura
Peneira 60x100 cm
Rede de arrasto malha 0,5 cm, linha de nylon multifilamento, 2 m de altura x 10 m de comprimento
Vara, linha e anzol e espinhéis

---

Os espécimes deverão ser sacrificados conforme Diretriz da Prática da Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). De todos os espécimes capturados, deverão ser medidos o comprimento padrão (mm) e peso (g), e retiradas amostras de tecido a serem conservadas em etanol 96% para análises genéticas. Em seguida os animais deverão ser fixados em formalina a 10%, devidamente etiquetados incluindo as coordenadas geográficas do local de coleta e data de captura. Após período de 24 a 48 horas, os indivíduos deverão ser transferidos para solução de etanol a 70%. Os espécimes a serem utilizados no estudo de conteúdo estomacal e gonadal deverão ser dissecados para remoção das vísceras (estômagos e gônadas).

### ***3.1.1. Registro fotográfico do material biológico coletado***

O registro fotográfico deverá ser realizado logo após a coleta, antes da fixação em formalina, a fim de garantir a fidelidade das características típicas de coloração para cada espécie, utilizando-se câmera digital, escala métrica e fundo padronizado.

### ***3.1.2. Composição e estrutura de comunidades***

A composição ictiofaunística deverá ser 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. As espécies deverão ainda ser classificadas como raras, endêmicas, ameaçadas de extinção, migradoras, reofílicas, comerciais (consumo e ornamental), alóctones ou exóticas invasoras.

A curva do coletor deverá ser apresentada e modelos de ajuste da curva deverão ser utilizados para estimativas da riqueza total, como Jackknife 1 e 2, Chao 1 e 2, ACE e ICE, e Bootstrap (COLWELL, CODDINGTON, 1994).

- Para a descrição da comunidade deverão ser apresentados os seguintes índices:
- Abundância relativa das espécies, em número e peso (MAGURRAN, 1988);
- Índice de Diversidade de Shannon-Wiener, com intervalos de confiança obtidos por meio da aplicação de procedimento 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;
- 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);

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

### ***3.1.3. Estrutura e dinâmica de populações***

Deverão ser apresentadas informações prévias ao acidente baseadas na literatura disponível para as espécies nativas (diagnóstico prévio) contendo: estrutura das populações das espécies nativas mais abundantes, das espécies de importância para a pesca comercial, amadora e ornamental.

Para as espécies com ocorrência na Área Ambiental 1 e constantes nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção, que não for possível a coleta dos dados sobre a dinâmica da população, deverá ser realizado um levantamento bibliográfico detalhando a biologia da espécie em questão.

Deverão ser apresentadas informações sobre relação peso comprimento, incluindo teste de adequação a hipótese de crescimento isométrico ou alométrico (quando for possível analisar para sexos separados) e de fator de condição relativo e alométrico (quando for possível analisar para sexos separados).

### ***3.1.4. Ecologia trófica***

Deverão ser analisados os conteúdos estomacais das espécies nativas mais abundantes, das espécies de importância para a pesca comercial, amadora e ornamental, utilizando-se métodos de ocorrência e volumétrico (HYNES, 1950; HYSLOP, 1980). Os percentuais obtidos com esses métodos deverão ser combinados no Índice Alimentar (IAI) de Kawakami e Vazzoler (1980).

Em caso de coleta de espécies ameaçadas de extinção, e que não seja possível sua devolução ao ambiente, estas também deverão ser submetidas a análise descrita neste item.

### **3.1.5. *Biologia Reprodutiva***

Deverão ser determinados os estádios de desenvolvimento gonadal das espécies nativas mais abundantes, das espécies de importância para a pesca comercial, amadora e ornamental, por meio da classificação de maturação gonadal determinada por Vazzoler (1996) e Brito e Bazzoli (2003). Poderá ser utilizada a classificação macroscópica das gônadas, contudo, parte dos indivíduos deverá ser também avaliada microscopicamente a fim de validar, estatisticamente, a classificação macroscópica de cada estágio.

Deverá ser determinado o tamanho médio em que metade da população possua gônadas desenvolvidas, estando apta a reprodução (L50), e o comprimento com o qual todos os indivíduos estão aptos a se reproduzir (L100), por sexos separados, e determinada a variação temporal da frequência de estádios de maturação gonadal considerando o ciclo hidrológico completo.

Deverá ser determinada a relação gonadosomática (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 deverão ser apresentados em gráfico.

Em caso de coleta de espécies ameaçadas de extinção, e que não seja possível sua devolução ao ambiente, estas também deverão ser submetidas a análise descrita neste item.

### **3.1.6. *Genética de populações***

Os estudos genéticos deverão ser realizados com base em marcadores microssatélites e marcadores populacionais em pelo menos 10 espécies de peixes nativas (de diferentes famílias) mais abundantes, migradoras e não migradoras, utilizando sequenciamento de DNA mitocondrial e nuclear. Deverão ser amostrados no mínimo 10 locos microssatélites, 2 sequências mitocondriais e 2 sequências nucleares de 30 indivíduos de cada população, incluindo as seguintes análises:

Estimativa da diversidade genética de espécies provenientes do rio Doce depositadas em coleções ou bancos genéticos antes da mortalidade causada pelo rompimento da barragem do Fundão;

Estimativa anual da diversidade genética das espécies coletadas na Área Ambiental 1 ao longo dos cinco anos do programa de monitoramento;

Obter números de frequências alélicas e número de alelos efetivos e privados por meio do programa PopGene v3.3 (RAYMOND, ROUSSET, 1995), e utilizá-los para o cálculo de outras estimativas de variabilidade genética. O mesmo programa deverá ser utilizado

para os cálculos de eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ );

Obter estatísticas de composição de nucleotídeos e padrões de substituições inferidos com a utilização do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013). A análise de divergência de sequência deverá ser inferida através da aplicação do algoritmo Kimura-2-parametros, K2P (KIMURA, 1980); e estatísticas de diversidade e polimorfismo de DNA deverão ser aplicadas sob as sequências dos marcadores a fim de se inferir taxas como a de diversidade haplotípica  $h$  (NEI, 1987), diversidade nucleotídica  $\pi$  (NEI, 1987), AMOVA (EXCOFFIER et al., 1992), endogamia e estruturação populacional  $\phi_{ST}$  (EXCOFFIER et al., 1992) e ocorrência de eventos de gargalo populacional entre outros, utilizando principalmente os softwares ARLEQUIN (EXCOFFIER et al., 2010), DNASP 5.4 (ROZAS et al., 2003) e BOTTLENECK (CORNUET, LUIKART, 1996).

### **3.1.7. DNA Mitochondrial barcoding**

Análises com o DNA mitocondrial deverão ser conduzidas para certificação da correta identificação taxonômica das espécies. Para tanto, deverão ser sequenciados segmentos parciais do gene mitocondrial COI para pelo menos 5 indivíduos de todas espécies coletadas em cada um dos locais de coleta ao longo do período do monitoramento. Para a amplificação e sequenciamento dos segmentos deverão ser utilizados os primers descritos por Ward et al. (2005).

As sequências obtidas deverão ser 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) deverão ser conduzidas por meio do site do Barcoding of Life (<http://www.barcodeoflife.org/>). Adicionalmente deverá ser desenvolvida uma biblioteca de DNA barcodes para as espécies nativas da bacia que ainda não possuem a sequência registrada.

As sequências obtidas deverão ser depositadas no banco de dados de forma a serem reconhecidas formalmente como sequências barcode das espécies em questão. Para tanto, deverão conter o nome da espécie, o voucher com os dados de catalogação e 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).

### **3.2. Ictioplâncton**

Os estudos desse componente deverão incluir as seguintes análises:

Identificação, a partir da distribuição espacial e temporal da abundância de ovos e larvas de peixes, dos ambientes mais relevantes para a desova;

Identificação de áreas utilizadas pelas espécies de peixes em seu desenvolvimento inicial (criadouros naturais);

Identificação de rotas utilizadas para migração e reprodução;

Descrição de gradientes espaciais e temporais das diferentes fases de desenvolvimento dos peixes (ovos, larvas em pré-flexão, larvas em pós-flexão) e inferência sobre os deslocamentos.

Importância dos afluentes para a recolonização da área afetada através da deriva de ovos e larvas de peixes.

As coletas deverão ser mensais no período de seca e quinzenais no período chuvoso, conforme descrito a seguir:

Realizadas duas vezes ao dia (às 05:00 horas e às 21:00 horas), durante 4 dias consecutivos por local de coleta, com duração de 10 minutos em cada horário.

Utilização de redes de plâncton com formato cônico cilíndrico dotadas de um copo coletor e fluxômetro para calcular o volume filtrado.

Para coleta de juvenis, utilização de peneirões e rede de emalhar (1,5, 2,0, 2,5 e 3 cm de distância entre nós opostos) nas margens e outros locais propícios à coleta de formas jovens.

Em ambientes lênticos, como reservatórios e remansos, coleta por arrastos superficiais e de meia água.

Em ambientes com características lóticicas, coletadas de superfície e fundo, além de coletas nas margens.

Em rios de menor porte, deverá ser utilizada amostragem ativa com peneiras e redes de ictioplâncton com cabo telescópico. Em córregos, utilizar rede de ictioplâncton.

Em locais que apresentem formações rochosas, pedras deverão ser lavadas para coleta de desovas adesivas.



O material coletado deverá ser acondicionado em frascos devidamente identificados (ponto amostral, hora, dia, mês), fixados e mantidos até a análise. Em cada ponto de amostragem, deverá ser preenchida a ficha de campo (anexo 2.2).

A triagem das amostras fixadas deverá ser feita sob microscópio estereoscópio, com as amostras colocadas em placas de acrílico do tipo Bogorov (ou de petri) para a separação dos ovos e larvas dos demais detritos.

A identificação deverá ser realizada com o auxílio de chaves taxonômicas, até o menor nível taxonômico possível. De forma complementar, ovos e larvas deverão ser identificados pela metodologia de DNA barcoding (BECKER et al., 2015).

A densidade de ovos e larvas na amostra deverá ser calculada de acordo com Tanaka (1973).

Os padrões de distribuição de ovos e larvas e sua correspondência com as variáveis ambientais coletadas deverão ser analisados por meio de comparação descritiva (gráficos), e de técnicas de análise uni e multivariada.

### **3.3. Flora aquática (fitoplâncton, perifiton, zooplâncton e macrófitas aquáticas)**

O material para elaboração do diagnóstico da flora aquática deverá ser coletado em todos os 26 pontos identificados na Figura 1, em ambas as margens e na calha central do Rio Doce, e adicionalmente nos pontos indicados na Figura 2, identificados como prioritários no estado do Espírito Santo, onde não há correnteza e se concentram os estandes de fitoplâncton, perifiton, zooplâncton e macrófitas aquáticas. As áreas prioritárias para a realização das coletas foram selecionadas de acordo com os critérios de ocupação da área e locais onde os impactos visuais da passagem da lama de rejeitos foram maiores, também foi utilizado o critério de seleção de áreas com maior ocorrência de estandes com fitoplâncton, perifiton, zooplâncton e macrófitas aquáticas.

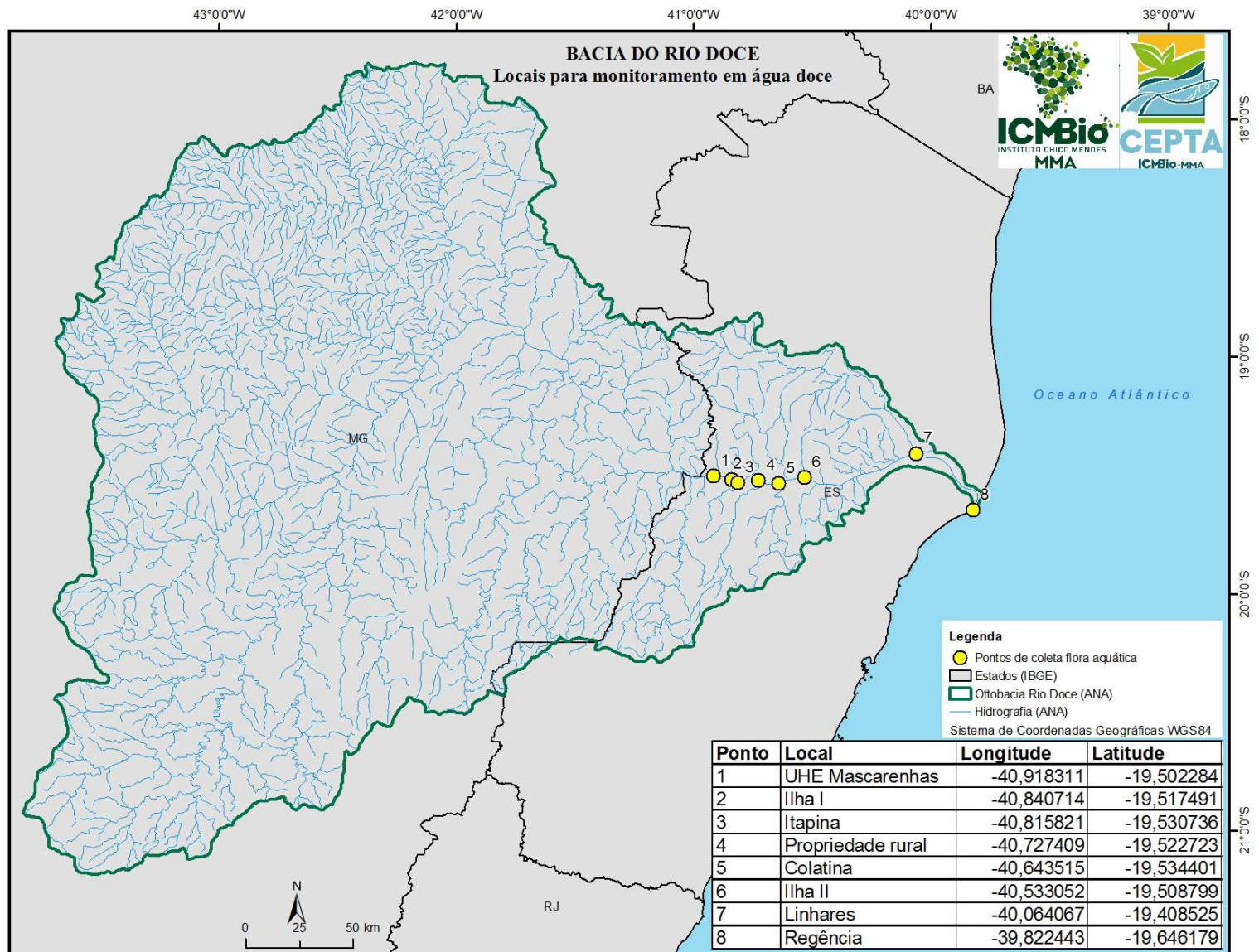


Figura 2. Pontos de coleta prioritários no estado do Espírito Santo para coleta de flora aquática.

As coletas deverão ser feitas em período quinzenal e deverão ser coletadas pelo menos três amostras de material vegetativo por ponto de coleta. Deverão ser determinados a temperatura e o pH da água, pois estes auxiliarão nas interpretações de testes bioquímicos em laboratório. A coleta do fitoplâncton deverá ser realizada com malha de náilon de abertura de 20  $\mu\text{m}$  (Figura 3) e na subsuperfície (aproximadamente 30 centímetros de profundidade). Os pontos de coleta deverão ser lançados de maneira aleatória às margens do rio e na calha central, onde se concentra a maior parte do material. A malha deverá ser corrida e o material que ficar retido deverá ser armazenado em sacos plásticos transparentes. Para as macrófitas aquáticas, o procedimento de coleta deverá utilizar o método do quadro, ou metodologia de Westlake. O método do quadro consiste na utilização de um quadro de madeira para delimitar as parcelas onde o material deverá ser coletado. Deverão ser fabricados quadros de madeira (Figura 04) com dimensões variáveis de acordo com cada caso. Para as coletas no Rio Doce, deverão ser utilizados quadros com 0,5 m<sup>2</sup>. Os quadros deverão ser lançados em pontos aleatórios dentro da malha amostral. Lançados os quadros, deverão ser coletadas pelo menos três partes de material vegetativo que devem ser transferidos para sacos plásticos transparentes e estéreis.

Todo o material coletado (fitoplâncton, perifiton, zooplâncton e macrófitas aquáticas) deverá ser conduzido a laboratórios especializados para as análises específicas que serão cruciais para elaboração do diagnóstico de qualidade da água e mensuração de impactos ambientais. Além das coletas de material para testes específicos deverão ser coletadas amostras para identificação botânica das espécies.

As coletas para identificação botânica deverão seguir a mesma metodologia das coletas para análise, contudo, o material deverá ser armazenado em sacos de papel. Todo o material que for coletado para identificação botânica deverá estar fértil (com flor e/ou fruto). Depois de coletado o material para identificação, o mesmo deverá ser prensado para confecção de exsiccatas e conduzido a um herbário registrado, onde será identificado e armazenado nas devidas condições.



Figura 03: Malha de náilon 20 $\mu$  m. A malha deverá ser utilizada como rede e passada a profundidade de 30 cm para coleta de fitoplâncton.

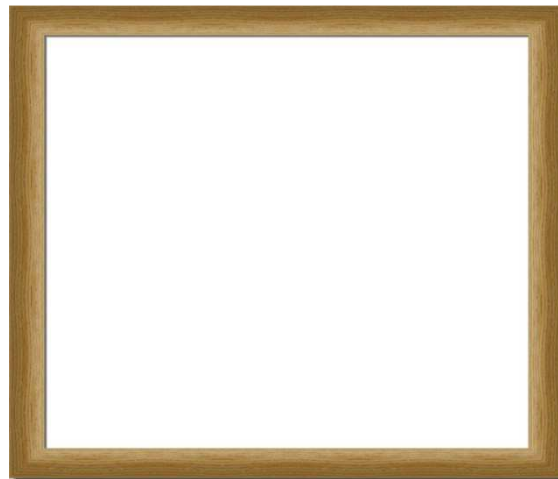


Figura 04: Quadro de madeira para amostragem de plantas aquáticas. Semelhante a uma moldura, pode ser facilmente confeccionado. Para ajudar a estabilizar o quadro, podem ser colocadas estruturas que deixem o aspecto parecido a uma mesa, mas que vão garantir que o quadro não flutue na água. As medidas do quadro são variáveis de acordo com cada metodologia.

### ***3.3.1. Densidade de Fitoplâncton***

Para o estudo quantitativo do fitoplâncton, amostras de 100 ml deverão ser acondicionadas em frascos escuros e fixadas com solução de lugol-acético. A densidade do fitoplâncton deverá ser estimada pelo método de Utermohl, em microscópio invertido de 25 a 450 aumentos, usando-se tempo de sedimentação de, pelo menos, 3 horas para cada

centímetro de altura da câmara (MARGALEF, 1983). O volume sedimentado por amostra deve ser de 10 ml.

### **3.4. Zooplâncton**

As amostras de zooplâncton deverão ser coletadas com auxílio de uma motobomba, filtrando 1000 litros de água por amostra, em uma rede de plancton de 63µm de abertura de malha. A abundância deverá ser determinada a partir da contagem das amostras em câmaras de **Sedgewick-Rafter**, sob microscópio ótico. As amostras deverão ser concentradas em um volume de 100 ml e as contagens realizadas a partir de 5 sub-amostras (de 10 ml) tomadas com pipeta do tipo Stempel, sendo a densidade final expressa em indivíduos.m<sup>-3</sup>. Após as contagens das 5 sub-amostras deverá ser realizada uma análise qualitativa da amostra. Em cada amostra, sub-amostras deverão ser analisadas até que nenhuma espécie seja acrescentada.

### **3.5. Macroinvertebrados bentônicos**

Deverá ser realizada nas estações de coleta uma amostragem exploratória buscando-se capturar exemplares de todas as populações existentes, utilizando-se draga Petersen (área de pegada mínima de 420 cm<sup>2</sup>). Como estas comunidades apresentam natureza agregada, a tomada de réplicas é obrigatória para aumentar a eficiência das amostragens realizadas. O número ideal de réplicas depende do ambiente em estudo, porém deverá ser aplicado um número mínimo de três réplicas por ponto amostrado. Deverão ser descartadas amostragens onde houver perda de material, seja por transbordo ou vazamentos de sedimento ao chegar à superfície, já que a perda de material é evidente. Considerando que a maior parte dos organismos concentra-se nos 10 cm superiores de sedimento, para amostragem adequada à draga deve estar preenchida com cerca de 2/3 a 3/4 de material. No intuito de prevenir a continuidade de processos interativos entre os organismos, como a predação, e a decomposição da amostra, que interferem resultado final, após a coleta, as amostras devem ser fixadas, ainda em campo, com formalina neutralizada (com bórax ou bicarbonato de sódio) em volume tal que a concentração final na amostra atinja de 4 e 10%. Ou seja, cerca de 100ml para cada litro de amostra.

Para análise, as amostras de sedimento devem ser lavadas com água corrente em rede com malha 0,25mm (recomendada para levantamento faunístico), reduzindo o volume

da amostra ao eliminar partículas orgânicas e inorgânicas finas, o que facilita a visualização dos organismos.

Após a lavagem, o preservante pode continuar a ser o formol 4-10% ou pode ser substituído por álcool 70, em volume tal que a proporção entre a amostra e o preservante não ultrapasse 1:2 (1/3), principalmente quando houver muito material orgânico.

Deverá ser realizado o levantamento quali-quantitativo com a identificação taxonômica com auxílio de guias especializados, até o nível de espécie quando possível. Para tal, a triagem deve ser realizada sob lupa (microscópio estereoscópico) o que possibilitará a identificação através da visualização de caracteres morfológicos externos dos indivíduos amostrados.

### **3.6. Perifíton**

A biomassa do perifíton deveser estimada. Adicionalmente, para análise da biomassa fotossintética deveser avaliados os teores de clorofila a e o material raspado nos diversos substratos deveser filtrados conforme técnica proposta por Golterman et al. (1978).

Deveser identificação de 4 trechos de rios, sendo um em condições de referência, um impactado por rejeitos de mineração, um impactado por despejo de efluentes e um impactado por efluentes e rejeitos de mineração, a serem amostrados 4 vezes no ano, sendo duas na estação chuvosa e duas na estação seca.

Em cada um desses ambientes será selecionado um tipo de substrato (seixo, cascalho, rocha exposta ou areia) comum aos 4 ambientes, dos quais serão coletadas 3 amostras quali-quantitativas do perifíton. A delimitação da área a ser coletada será feita com o auxílio de uma lâmina de acetato da qual será removido um quadrado de 10 cm de lado, de forma que a lâmina de acetato funcione como uma moldura da superfície a ser amostrada. Após a coleta as amostras destinadas a análises qualitativas serão fixadas com solução TRANSEAU (6:3:1 água destilada, álcool etílico 70%, formol) e as destinadas a análises quantitativas serão fixadas em solução de Lugol acético a 5%.

### **3.7. Caracterização da pesca**

#### **3.7.1. Pesca comercial**

A atividade pesqueira comercial deverá ser caracterizada anualmente em toda a área ambiental 1 gerando as seguintes informações:

Locais de desembarque: quantidade, localização, da comunidade, infraestrutura de apoio à pesca, formas de associativismo, hábitos de pesca, etc;

Embarcações de pesca: tipos, quantidade por tipo, características principais, pescarias que desenvolvem;

Pescadores: número, idade média, tempo de pesca, registro na entidade de classe, registro no órgão governamental;

Artes ou aparelhos de pesca: tipos, quantidade por tipo, características principais, espécies capturadas;

Espécies: nome comum, nome científico, arte de pesca utilizada na captura, área de captura, período de safra, destino da produção, (consumo local, venda, descarte); Tipos de Pescarias: embarcação utilizada, arte de pesca, característica da operação, espécies capturadas, sistema de conservação do pescado;

Preço de primeira comercialização: Preços por espécies pagas ao pescador, variações estacionais, tendências temporais;

Devem ser descritas a estatística descritiva e a infraestrutura variação temporal (incluindo a cota/ciclo hidrológico) e espacial das informações coletadas, tais como:

Produção pesqueira total e por espécie;

Produção pesqueira por frota (estratificar, quando for o caso);

Produção pesqueira por tipo de apetrecho;

Esforço de pesca (número de pescadores, operações de pesca por frota etc, operações por petrecho);

CPUE por espécie e para a captura total, considerando as unidades de esforço de pesca pertinentes.

### **3.7.2. Pesca de subsistência**

Esta modalidade de pesca também deverá ser caracterizada anualmente, por meio da estimativa da quantidade de pescado consumida pelos moradores residentes na área afetada. Esses dados poderão ser obtidos de forma secundária junto ao IBGE, porém quando não disponíveis, deverão ser obtidos por recenseamento, e subsequente delineamento amostral. Conforme metodologia descrita por Cerdeira et al. (2007), deverão ser obtidas informações como: tipo de alimento consumido pelas famílias, quantidade consumida de cada item alimentar (g), período do dia que foi consumido e número de pessoas por família. No caso dos peixes consumidos, esses deverão ser separados por espécie e pesados inteiros, sem tratamento prévio.

### **3.7.3. Integridade ambiental**

A integridade ambiental de cada ponto amostral deverá ser avaliada visualmente com base em características fisionômicas. Para isso, deverão ser preenchidas fichas de campo, as quais permitirão avaliar o status dos diferentes habitats. Uma dessas fichas deverá se basear no “Índice de Integridade do Habitat – IIH”, proposto por Nessimian et al. (2008). A ficha para a obtenção desse índice é composta por 12 itens que possuem de quatro a seis alternativas, onde a máxima pontuação que pode ser atingida é 1 e a mínima é 0. Outra ficha baseia-se no “Protocolo de Avaliação Ambiental - PAA”, proposta por Callisto et al. (2002). Nesse caso, a ficha é composta por 22 itens que possuem de três a quatro alternativas, onde a máxima pontuação que pode ser atingida é 100 e a mínima é 0.

Nos dois casos, as pontuações refletem o nível de preservação ecológica, no entanto o PAA atribui conceitos aos ambientes de acordo com suas pontuações, sendo impactado, de 0 a 40 pontos; alterado, de 41 a 60 pontos; e natural, acima de 61 pontos. Tais medidas foram realizadas com base na atual necessidade de se desenvolver ferramentas que forneçam um critério biológico/ambiental para monitoramento dos ecossistemas aquáticos (ESTEVEZ, ALEXANDRE, 2011).

As avaliações de integridade ambiental serão complementadas por medidas de fatores abióticos, tomadas por medidores digitais de campo, tais como: temperatura (°C), pH, TDS (total de solutos dissolvidos), salinidade, condutividade e fluxo. Tais medidas são de grande importância para conhecimento do ambiente aquático e das perturbações que afetam a biota, sejam elas naturais ou antrópicas (BUSS et al., 2003).



## **4. Do prazo de execução e produtos**

### **4.1. Prazos**

Nos termos da cláusula 165 do Termo de Transação e de Ajustamento de Conduta, a Fundação deverá custear a implementação de medidas de monitoramento da flora e da fauna ao longo de toda a malha amostral (26 pontos) além da foz do Rio Doce e ambientes estuarinos e marinhos impactados, devendo:

I. Apresentar, até o último dia útil de junho de 2016:

a) Descrição metodológica das medidas de monitoramento da flora e fauna do Rio Doce e ambientes estuarinos e marinhos impactados.

II. Realizar e apresentar os resultados, até o último dia útil de maio de 2017, dos estudos para:

a) identificação e caracterização do impacto agudo e crônico sobre as espécies e cadeia trófica dos ambientes dulcícolas, estuarino e marinho;

III. Implementar e executar as medidas de monitoramento referidas nesta Cláusula num período mínimo de 5 anos, a partir da aprovação da proposta de programa de monitoramento por parte do ICMBio.

PARÁGRAFO PRIMEIRO: A partir do primeiro dia útil de julho de 2017, as medidas de monitoramento referidas neste programa e os parâmetros decorrentes dos resultados dos estudos previstos nos parágrafos anteriores deverão ser integrados.

PARÁGRAFO SEGUNDO: O programa de monitoramento previsto nesta Cláusula deverá ser conduzido por equipes de reconhecida competência técnico-científica, prioritariamente que integram Instituições de Ensino e Pesquisa (Universidades e Institutos de Pesquisa técnico-científicas) e supervisionado pelo ICMBio, em articulação com os demais ÓRGÃOS AMBIENTAIS, que monitorarão sua execução.

### **4.2. Produtos**

- a) Cronograma e planejamento logístico de execução dos estudos, a ser apresentado ao ICMBio em até 15 dias antes da primeira coleta;
- b) Relatórios científicos semestrais, contendo a metodologia empregada, resultados e discussões; análise integrada abrangendo todos os componentes monitorados; proposição de ações e medidas de recuperação; avaliação da necessidade de ajustes metodológicos e sugestões.
- c) Base de dados do monitoramento, contendo as planilhas eletrônicas com os dados de campo e as imagens em formato digital - a ser entregue semestralmente e que deverão integrar uma base de dados com acesso público e gratuito.

## 5. REFERÊNCIAS

- BECKER, R. A., SALES, N. G., SANTOS, G. M., SANTOS, G. B., CARVALHO, D. C. DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the Upper Paraná and São Francisco. **Journal of Fish Biology**, v. 87, n. 1, p. 159-168, 2015.
- BRITO, M. F. G., BAZZOLI, N. 2003. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arch Med Vet**, v. 55, p. 624-633, 2003.
- BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 465-473, 2003.
- CALLISTO, M.; FERREIRA, W. R.; MORENO, P.; GOURLART, M.; PETRUCIO, M. Aplicação de um protocolo de avaliação rápida da diversidade de habitats em atividades de ensino e pesquisa (MG-RJ). **Acta Limnol. Bras.** v. 14, n. 1, p. 91-98, 2002.
- CERDEIRA, A. L.; GAZZIERO, D. L. P.; DUKE, S. O.; MATALLO, M. B.; SPADOTTO, C. A. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosato-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, p. 539-549, 2007.
- COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 345, n. 1311, p. 101-118, 1994.
- ESTEVEZ, K. E.; ALEXANDRE, C. V. Development of an index of biotic integrity based on fish communities to assess the effects of rural and urban land use on a stream in southeastern Brazil. **Internat. Rev. Hydrobiol.** V. 96, n. 3, p. 296-317, jun. 2011.
- Fore L.S., (2010). Evaluation of stream periphyton as indicators of biological condition for Florida streams. Final Report. Tallahassee, FL, USA: Florida Department of Environmental Protection.

- GAUCH JR, H. G. **Multivariate Analysis in Community Ecology**. Cambridge University Press, Cambridge, England. 1982. 298 p.
- Giogi, A. & Malacalza, L., (2001). Effect of an industrial discharge on water quality and periphyton structure in a pampean stream. *Environmental Monitoring and Assessment*, 75: 107 – 119.
- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwater**, Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1978, 213p.
- HYNES, H. B. N. The food of freshwater sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* and *Pygosteus pungitius*) with a review of methods used in studies of the food of fishes. **J. Anim. Ecol.**, Oxford, v. 19, p.36-58, 1950.
- HYSLOP, E. J. Stomach content analysis: a review of methods and their applications. **J. Fish Biol.**, Southampton, v. 17, no. 4, p. 411-429, 1980.
- KAWAKAMI, E.; VAZZOLER, G. Método gráfico e estimativa de índice alimentar aplicado ao estudo de alimentação de peixes. **Bol. Inst. Oceanogr.**, São Paulo, v. 2, n. 29, p. 205-207, 1980.
- Lewis et al. (1999). PERIPHYTON AND SEDIMENT BIOASSESSMENT IN NORTH FLORIDA BAY. *Environmental Monitoring and Assessment* 65:503–522.
- MAGURRAN, A.E. **Ecological diversity and its measurement**. Croom HEBN, London. 1988. 179p.
- MANLY, B. F. J. **Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology** (2nd Edition). Chapman & Hall, London, UK. 1997.
- MARGALEF, R. **Limnología**. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. 1983. 1010 p.
- MCNAUGHTON, S. J. Structure and Function in California Grasslands. **Ecology**, v. 49, p. 962-972, 1968.
- NESSIMIAN, J. L.; VENTICINQUE, E. M.; ZUANON, J.; De MARCO Jr., P.; GORDO, M.; FIDELIS, L.; BATISTA, J. D.; JUEN, L. Land use, habitat integrity, and aquatic insect assemblages in Central Amazonian streams. **Hydrobiologia**, v. 614, p. 117–131, jul. 2008.
- SMITH, B.; WILSON, J. A Consumer's Guide to Evenness Indices. **Oikos**, v. 76, n. 1, p. 70-82, 1996.
- TANAKA, S. Stock assessment by means of ichthyoplankton surveys. **FAO Fish tech. Pap.**, v. 122, p. 33-51, 1973.
- TER BRAAK, C. J. F.; ŠMILAUER, P. **CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination** (version 4.5). Microcomputer Power, Ithaca NY, USA. 2002. 500 p.
- VAZZOLER, A. E. A. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996. 169 p.
- WARD, R. D., ZEMLAK, T. S., INNES, B. H., LAST, P. R., HEBERT, P. D. DNA barcoding Australia's fish species. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 360 n. 1462, p. 1847-1857, 2005.

## ANEXO 2.2

### CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL DO ENTORNO - BACIA DO RIO DOCE

Data da Inspeção: \_\_\_\_\_

Horário: \_\_\_\_\_ h \_\_\_\_\_ min

#### I) INFORMAÇÕES GERAIS:

Área de estudo: \_\_\_\_\_

Denominação no mapa: \_\_\_\_\_

Denominação local: \_\_\_\_\_

Acessos: ( ) Rodovia            ( ) Estrada de terra            ( ) Aceiros/Picadas            ( ) Rio

Coordenadas do local: \_\_\_\_\_

Fotos: de \_\_\_\_\_ a \_\_\_\_\_

#### II) NÍVEL DAS ÁGUAS:

( ) Mínimo                      ( ) Médio                      ( ) Máximo

#### III) SUBSTRATO:

- ( ) serrapilheira
- ( ) cascalhos/seixos
- ( ) areia muito grossa
- ( ) areia grossa
- ( ) areia média
- ( ) areia fina
- ( ) areia muito fina
- ( ) lama

#### IV) ESTRUTURAS ARTIFICIAIS:

- ( ) Diques/ barramento de água
- ( ) Canais de escoamento
- ( ) Pontes/passarelas/deques
- ( ) Cercados
- ( ) Casas/construções
- ( ) Esgoto/efluentes
- ( ) Outros:

Fotos: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**V) AGRICULTURA:**     SIM                       NÃO

**VI) PECUÁRIA:**         SIM                       NÃO

**Fotos:** \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

**VII) ESGOTO/EFLUENTES:**     SIM                       NÃO

**Fotos:** \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

**VIII) DEGRADAÇÃO DO AMBIENTE:**

Erosão

Presença de lama de rejeitos de mineração

Assoreamento

**Fotos:** \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

**IX) DADOS BIOLÓGICOS:**

**Macrófitas:**

Nenhuma

Poucas

Moderado

Muitas

**Fotos:** \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

**Mata ciliar/ripária**

Ausente

Pouca

Razoável

Bom

Contínua

Descontínua

**Tipo de Vegetação**

Nativa

Reflorestamento

Fragmentos florestais

UCs próximas

**Fotos:** \_\_\_\_\_

**Observações:** \_\_\_\_\_

## QUALIDADE DA ÁGUA

<b>Parâmetros</b>	<b>Superfície</b>	<b>Fundo</b>	<b>Equipamento</b>
Temperatura ar (°C)			
Transparência (cm)			
Profundidade (cm)			
Temperatura água (°C)			
Condutividade (uS/cm)			
OD (mg/L)			
OD (%)			
pH (medida tradicional)			
pH 1 (medida alternativa)			
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>			
NH <sub>3</sub>			

**Observações:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_