

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM ECOSISTEMAS
FLUVIAIS AMAZÔNICOS

DANIELE KASPER

Manaus, Amazonas

Abril, 2014

DANIELE KASPER

**DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM ECOSISTEMAS
FLUVIAIS AMAZÔNICOS**

ORIENTADOR: DR. BRUCE RIDER FORSBERG

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Ecologia.

Manaus, Amazonas

Abril, 2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. Pedro Sérgio Fadini – Universidade Federal de São Carlos

Parecer: Aprovada

Dr. Jean Remy Davée Guimarães – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Parecer: Aprovada

Dr. Reinaldo Luiz Bozelli – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Parecer: Aprovada

Dra. Helena do Amaral Kehrig – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Parecer: Aprovada com correções

Dr. Ézio Sargentini Júnior – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Parecer: Aprovada

Dr. Bruce Gavin Marshall – Universidade Federal do Amazonas

Parecer: Aprovada

Dra. Sandra Beltran Pedreros – Faculdade La Salle Manaus

Parecer: Aprovada

FICHA CATALOGRÁFICA

K19 Kasper, Daniele
Dinâmica sazonal do metilmercúrio em ecossistemas fluviais amazônicos / Daniele Kasper. --- Manaus : [s.n.], 2014.
xx, 106 f. : il. color.

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2014.
Orientador : Bruce Rider Forsberg.
Área de concentração : Ecologia.

1. Limnologia. 2. Metilação. 3. Reservatório de Balbina.
I. Título.

CDD 574.5263

Sinopse:

Concentração de metilmercúrio na água e características limnológicas foram determinadas ao longo dos rios Solimões/Amazonas e Negro e seus principais tributários nas estações cheia e seca. Foi avaliada a estratificação do reservatório de Balbina ao longo de um ano, e sua influência sobre o ciclo do mercúrio à montante da barragem e ao longo do rio Uatumã, à jusante da barragem.

Palavras-chave: Limnologia, metilação, bioacumulação, rio Negro, rio Amazonas, reservatório de Balbina

Dedicatória

Ao Rafa e à minha mãe.

A tese não existiria sem o
carinho, amor e apoio de vocês.

Agradecimentos

Um dos maiores aprendizados do meu curso de doutorado não foi estudar o ciclo do mercúrio, não está relacionado a questões filosóficas, estatísticas... O maior aprendizado foi entender que a pesquisa na região amazônica é impossível sem colaboração e parcerias. Durante o doutorado, inúmeros desafios e problemas ocorreram (eles sempre acontecem em todas as teses). Mas, estudando “a” Amazônia “na” Amazônia, eu descobri que estes desafios chegam na mesma escala da bacia (são enormes!!!). Após passar por todo esse processo eu admiro ainda mais aqueles pesquisadores que vem se dedicando há anos às pesquisas na região. Agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, me ajudaram a desenvolver o trabalho (e foram muuuitas pessoas). Desde atitudes mais simples até problemas complexos, todos que me ajudaram merecem o meu mais profundo e sincero OBRIGADA. Em especial, agradeço...

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo apoio logístico e oportunidade de cursar a pós-graduação.

Às agências financiadoras que possibilitaram a realização deste trabalho: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Pesquisa Translacional em Saúde e Ambiente na Região Amazônica (INCT-INPeTAM/CNPq/MCT).

Ao Bruce Forsberg pelos ensinamentos e estímulo ao meu aprendizado. Muito obrigada pela enorme paciência, pela confiança no meu trabalho, por me dar a oportunidade e me incentivar a trabalhar onde, quando, como e com o que eu quisesse. Obrigada pelas longas conversas sobre ciência e sobre a vida.

À Equipe da Amazonas Energia (Stella Lazzarini, Alexandre, Jussival Novaes, Mundako e Juarez) pelo suporte logístico nas coletas em Balbina. Ao Jussival Novaes e Thiago dos Santos pela disponibilização dos dados de limnologia.

À equipe SEPROR por disponibilizar o laboratório durante nossas coletas de Balbina.

Ao ICMBio pelas autorizações de coleta e pelo suporte logístico com alojamentos, carros, e tudo o que foi preciso para as coletas em Balbina.

Ao IBAMA pela licença de coleta no Parque Nacional do Jaú e à equipe deste parque nacional, que auxiliou muito durante as coletas (analistas do Parque e ao “Ninja” que nos auxiliou pilotando o barco nas cachoeiras).

Ao Eraldo e sua equipe, que tornaram as expedições fluviais sempre muito agradáveis. Todos sempre com sorriso e simpatia nos ajudaram em tudo o que foi possível para que a coleta ocorresse. À Dona Graça meu agradecimento especial pela comida deliciosa e seu carinho de mãe sempre acolhedor.

Aos comunitários que vivem ao longo dos rios que visitamos, que nos ajudaram das mais diversas formas (com comida, abrigo para chuva, informações sobre os rios, com um carinho, um sorriso).

Ao João Rocha. Como agradecer? Vou ter que usar uma frase dele para descrevê-lo: “pense numa pessoa maravilhosa, agora multiplique...” esse é o Jããão! Sempre disposto a fazer qualquer coisa pra ajudar... desde filtrar a água naquelas longas noites de filtração até fazer um sanduíche pra tornar o dia mais agradável. Por sua causa comi a primeira goiaba da vida, aprendi a jogar dominó e a fazer sobremesa de cupuaçu, entendi pra que serve a folha do cajueiro e aprendi a cantar as músicas mais bregas que os cantores brasileiros já produziram!!! Muito, muito obrigada por tudo.

Ao meeeega parceiro João “Minhoca” Amaral. Muito obrigada por toda ajuda durante esses anos. Passando looongas horas em laboratório arrumando material, filtrando água, coletando, discutindo os resultados, ideias... enfim, sem sua ajuda a tese não seria a mesma. Além disso, muito obrigada pelo mega companheirismo “psicológico”, pelas longas conversas do tipo “calma, tudo vai dar certo”. Obrigada pela amizade!

Ao Eric Pereira pela ajuda com os cálculos de áreas de bacia, podzóis e áreas alagáveis.

Ao Bruno Lima (Brunãooo), muito obrigada por toda ajuda durante cada etapa do doutorado. Sempre disposto a ajudar no que fosse necessário. Sempre ao meu lado com sua calma e tranquilidade.

À Sarah Py-Daniel pela ajuda em diversas etapas. Coletando comigo, engarrafando amostras que pareciam não ter fim.... ahhhhh... pela ajuda no lab, pelas conversas e discussões, enfim,

pela ajuda em todas as etapas. Inclusive pelos momentos de risada em meio às músicas do Joãozinho... “Sarah, minhas cartas você não responde...”

À Graziela Balassa, pela amizade e por ter feito a coleta de amostras na campanha de setembro/2012 no Solimões. Sem sua ajuda eu não teria realizado.

Ao Anderson “puuuââââzzz”... Muito obrigada pela ajuda e pelos ensinamentos em relação aos cálculos de vazão e TSS. Obrigada também pela ajuda com as coletas, sempre parceiro, mesmo que “quase se afogue com a rede de plâncton”.

À Giselle, que por milhões de vezes me ajudou com as burocracias infernais, notas, recibos... sempre alegre e pronta pra ajudar.

Aos demais membros (ou ex-membros) do Laboratório de Ecossistemas Aquáticos (INPA) que ajudaram das mais diversas formas: carregando material, trocando ideias, sugerindo alterações no plano de trabalho, conseguindo água destilada, ou simplesmente com um carinho, uma palavra de apoio. Especialmente agradeço ao Sewbert Jati (com suas explicações sobre o “rio que sobe”), Diego, Veber, Moema, Otávio e Bruce Marshal.

Ao Wanderley Rodrigues Bastos e Olaf Malm por terem aberto as portas do laboratório para mim. Todas as análises de mercúrio deste trabalho foram feitas nos laboratórios de Biogeoquímica Ambiental (UNIR) e Radioisótopos (UFRJ). Muito obrigada Wander e Olaf pela confiança e disposição de deixar o laboratório, equipamentos e reagentes à disposição no momento da tese que mais precisei. Sem dúvida, sem a ajuda de vocês esta tese não existiria.

Aos integrantes do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (UNIR) pela ajuda com as análises de mercúrio. Muito obrigada por todo o apoio de vocês, pelos ensinamentos, dicas, informações e pelo carinho com que me receberam em Porto Velho. Em especial agradeço: Roberta, Marília, Ronaldinho, Igor, Leidiane, Dario, Denilça, Vitor, Cleber, Márcio e Andressa.

Aos integrantes do Laboratório de Radioisótopos (UFRJ) pela ajuda com as análises e pela amizade. Ainda me sinto em casa, viu?! Em especial agradeço: Larissa, Ricardinho “faz pra mim”, Glenda, Dani Botaro, Petrus, Renan, Sara e Adan.

Ao Joel Creswell pelas dicas com o uso do MERX, e sua disposição para responder as minhas milhões de dúvidas.

À Diana da Tekran pelo auxílio com o uso do Tekran.

Aos pesquisadores que me auxiliaram muito no início do meu projeto de tese, com ideias para o projeto e também com dicas de análise, sempre muito solícitos em me auxiliar (Pedro Fadini, Márcia Cristina Bisinoti, Wilson Jardim, Edenise Garcia, Fabíola Valdez, Jansen Zuanon, Bruce Nelson, Carlos Edwar, Rubens Honda).

Aos avaliadores da tese (Pedro Fadini, Helena Kehrig, Reinaldo Bozelli e Jean Guimarães). Obrigada pelos comentários e sugestões que tornaram o texto da tese melhor.

Aos avaliadores da minha defesa de tese (Ézio Sargentini, Sandra Beltran, Bruce Marshall, Rafael Duarte e Sávio Ferreira). Obrigada por terem aceitado o convite de participar da banca e pelas valiosas sugestões.

Ao Ézio e ao Marcos por terem me auxiliado com o uso do laboratório, com dicas para as análises, fornecendo água MilliQ, espaço no laboratório e material sempre que solicitei.

À Dona Maria Inês do Laboratório de Nutrição de Peixes e ao Geângelo e Isolde do Laboratório de Sementes, ambos no INPA, que me auxiliaram com o uso do liofilizador, secando litros e litros de amostras de plâncton.

Aos integrantes do Laboratório de Solos que sempre estiveram dispostos a me auxiliar com equipamentos, espaço, água destilada e tudo o mais que foi necessário. Em especial, muito obrigada pela ajuda Sr. Orlando!

À Sandra Beltran Pedreros pela ajuda com a instalação do AFS-Tekran e início das instalações no laboratório.

Às queridas Luciana (Lut) e Tática pelo mega acolhimento em Porto Velho. A estadia em Rondônia foi simplesmente maravilhosa!!!! Muito obrigada pelo mega carinho que me deram.

Ao Rosseval Leite pelo empréstimo da rede de plâncton em todas as coletas de Balbina.

Ao Efrem Ferreira pelo empréstimo de material de campo (redes de plâncton, garrafa de van dorn e tudo o mais que foi necessário).

Aos pesquisadores Eurisângela e Carlos Edwar pelo auxílio na coleta dos peixes em Balbina.

Ao Jansen Zuanon pela ajuda com a coleta e identificação dos peixes. Mas principalmente pelo carinho que tem por todos nós, alunos. Sempre dando conselhos, conversando, e disposto

a achar um “rumo” quando a gente acha que a tese está perdida. Muito obrigada pela energia positiva e por “torcer” pela tese.

À Rejane Oliveira Freitas que disponibilizou o laboratório e material para as nossas análises, coletas... Muito obrigada pela confiança e disposição em ajudar sempre.

A todas as pessoas que participaram das campanhas do PRONEX e que me ajudaram das mais diferentes formas durante as coletas. Em especial agradeço (além dos já citados acima): Pedro, “Wilsinho”, Vinícius (Farjalla), Albert, Sérgio, Rafael, Waltinho, Soraya, “Dani +”, Juliana, Saulo “los hermanos”, Thiago, Reinaldo, Ynglea, etc.

Ao Laboratório de Limnologia (UFRJ) pela ajuda com as análises de COD.

Às meninas do laboratório da Sid, que transformavam o café da tarde sempre em uma grande festa. Obrigada pelas inúmeras risadas, biscoitinhos e por terem ouvido meus lamentos enquanto a tese não saía da cabeça pro papel.

À Sarah, Natália, Cris e ao Tiago e Minhoca que se disponibilizaram para me ajudar com a entrega da tese.

Ao Cesar Horie e ao Idelfonso Ferreira Canto pela ajuda com dados de precipitação de Balbina.

Aos professores e alunos do curso de campo EFA 2010. Foi muito inspirador conhecer vocês.

À Laura Fróes e à Elizandra pela ajuda com a análise taxonômica do plâncton.

Aos amigos da “minha turma do BADPI” e os da turma da Ecologia.

Aos meus queridos velhos e novos amigos. Vocês foram simplesmente fantásticos durante toda a jornada. Sempre me apoiando, aconselhando ou simplesmente me fazendo rir quando eu só precisava relaxar. Pati, Thamilla, Leandro, Léo, Wendelson, Andréia, Maxxx, Renata, Tiago, Laura, Júlio, Gislene, Marcelo, Vitão, Larissa, Alessandro, João Henrique, Dani, João Rocha, Bruno, Sarah, Grazi, Paloma, Renata Melo, Sylvia, Akemi, Cris, Thiago “Titica”, Natália, Rafaela, Bruno Burns, Douglas, Ghidini, Euri, André Galuch, Rodrigo, Roxaneh, Izaias e Zu. Vocês moram no meu coração!

E por último (de propósito por ser o mais especial) quero fazer um agradecimento à minha família, que me apoiou durante cada momento. Obrigada por entenderem a minha ausência

em diversos momentos importantes da vida e por me “aturarem” quando tudo parecia impossível. Sem o apoio e o carinho incondicional de vocês eu não teria conseguido. Obrigada pelos presentes que chegavam de tempos em tempos (pimentão vermelho, biscoitinhos do sul...), pelo abrigo, pelas caronas até o Fundão, pelas longas conversas e conselhos. Ao Rafa, meu companheiro em todos os momentos, todas as situações... minha mãe, minhas irmãs, tia Mércia, tio Martinho, André, Thiago, Marlon, Di, Dani, Gi, Bruno, Breno, Duda e Natalia. Vocês são a maior inspiração pro meu trabalho e pra minha vida. Muito obrigada!!!! Amo vocês!

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento.”

Albert Einstein

Resumo

Rios amazônicos são caracterizados pela alta diversidade natural de qualidade da água entre as sub-bacias. Áreas alagáveis extensas associadas a estes rios são inundadas sazonalmente levando à estratificação termal, que combinada com o grande aporte de matéria orgânica alóctone resulta em condições anóxicas especialmente propícias à metilação do mercúrio (Hg). A grande variação sazonal e espacial das condições limnológicas e a natureza relativamente preservada da maioria das bacias de drenagem tornam os rios amazônicos locais interessantes para o estudo da dinâmica natural do metilmercúrio (MeHg). A enorme vazão dos rios amazônicos também faz deles locais interessantes para os represamentos hidrelétricos. No Brasil, um grande percentual da energia elétrica vem de hidroelétricas, e muitas delas têm sido planejadas ou construídas nos rios amazônicos. Barramentos podem ter um grande impacto na dinâmica do MeHg do rio, acima e abaixo da barragem. Estudos tem demonstrado que os rios à jusante de uma barragem podem ser mais contaminados por Hg do que o próprio reservatório. Entretanto, não é claro até que distância esta contaminação ocorre à jusante e como ela varia sazonalmente. Este estudo objetivou investigar a influência do pulso de inundação sazonal e as variações associadas aos parâmetros limnológicos sobre a dinâmica do MeHg nos principais tributários brasileiros do rio Amazonas. Este também objetivou investigar os efeitos do represamento na dinâmica e bioacumulação do MeHg acima e abaixo da barragem do reservatório de Balbina. Amostras de água foram coletadas ao longo do rio Amazonas e nos seus principais tributários brasileiros ($n = 38$) durante duas fases distintas do ciclo do pulso de inundação (estações cheia e seca). Água, plâncton e peixes foram coletados ao longo de um ano no reservatório de Balbina e em diferentes locais entre 0,5 e 250 km à jusante da barragem. Condições limnológicas foram medidas paralelamente à coleta de água em cada local. A concentração de MeHg na água dos rios variou entre 0,02 e 0,76 ng.L⁻¹. Estas concentrações aumentaram com a cota dos rios ($r^2 = 0,528\%$; $p < 0,0001$) e diminuíram com as concentrações de oxigênio dissolvido (regressão múltipla: $F = 11,5$; $r^2 = 0,443$; $p < 0,001$). O transporte de MeHg foi muito maior em todos os rios na cheia, devido às maiores concentrações de MeHg e de vazão da água, demonstrando a influência dominante do pulso de inundação do rio sobre a dinâmica do MeHg no sistema fluvial. As concentrações de MeHg na água do reservatório de Balbina foram substancialmente maiores no hipolímnio anóxico quando comparado com o epilímnio. As altas concentrações de MeHg na água do hipolímnio exportado do reservatório para o rio diminuíram gradualmente para concentrações base a 200 km à jusante da barragem. Uma distribuição uniforme do MeHg e do oxigênio foram encontradas ao longo das diferentes profundidades do reservatório somente durante a estação chuvosa quando a mistura vertical foi grande e coincidiu com concentrações de MeHg uniformes ao longo do rio à jusante da barragem. Concentrações de MeHg no plâncton e de Hg total nos peixes dos locais à jusante foram maiores do que os valores do reservatório, sugerindo que o MeHg exportado da barragem foi acumulado pela biota. As concentrações de MeHg em ambos sistemas, rios naturais e represado, foram influenciadas pela sazonalidade e o oxigênio dissolvido foi o principal preditor da variação. Nos tributários do rio Amazonas, o nível da água dos rios influencia na disponibilidade de áreas alagáveis, que altera os parâmetros limnológicos, especialmente o oxigênio dissolvido, e a dinâmica do MeHg. No reservatório de Balbina, onde o nível da água é controlado manualmente, as épocas de chuva e seca influenciam a limnologia do reservatório, e, conseqüentemente, a dinâmica do MeHg. A influência da hidrelétrica nas concentrações de MeHg diminui ao longo do rio à jusante, enquanto que aumenta a influência da inundação das áreas alagáveis naturais.

Abstract

Seasonal dynamics of methylmercury in fluvial Amazonian ecosystems

Amazonian rivers are characterized by high natural diversity of water quality among sub-basins. Extensive areas of floodplain associated with these rivers are inundated seasonally leading to thermal stratification, which combined with large inputs of allocthonous organic matter results in anoxic conditions especially conducive to mercury (Hg) methylation. The large seasonal and spatial variation of limnological conditions and the relatively undisturbed nature of most drainage basins make Amazonian rivers interesting sites for studying the natural dynamics of methylmercury (MeHg). The huge discharge of Amazonian rivers also makes them important sites for hydroelectric impoundments. In Brazil, a large percentage of electric energy comes from hydroelectric dams, with many of them planned or already constructed on Amazonian rivers. Damming a river can have a major impact on MeHg dynamics in a river system, both above and below the dam. Studies have shown that rivers downstream from a dam can be more contaminated by Hg than in the reservoir itself. However, it is not clear how far downstream this contamination occurs and how it varies seasonally. This study aimed to investigate the influence of the seasonal flood pulse and associated variations in limnological parameters on the dynamics of MeHg in the principal Brazilian tributaries of the Amazon river. It also aimed to investigate the effects of impoundment on MeHg dynamics and bioaccumulation both above and below a dam. Water samples were collected in the Amazon main stem and its main Brazilian tributaries ($n = 38$) during two distinct phases of the flood-pulse cycle (high and low-water seasons). Water, plankton and fish were collected for one year in Balbina reservoir and in different sites between 0.5 and 250 km downstream from the dam. Limnological conditions were measured at the same time of water collection at each site. The MeHg concentrations in river waters varied between 0.02 and 0.76 ng.L^{-1} . These concentrations increased with water level ($r^2 = 0.528\%$; $p < 0.0001$) and decreased with dissolved oxygen concentrations (multiple regression: $F = 11.5$; $r^2 = 0.443$; $p < 0.001$). Due to higher MeHg concentrations and water discharge, MeHg transport was much higher in all rivers at high water, demonstrating a dominant influence of the flood pulse on MeHg dynamics in river systems. The MeHg concentrations in water from Balbina reservoir were substantially higher in the anoxic hypolimnion when compared with the epilimnion. The high MeHg concentrations in hypolimnetic water exported from the reservoir to the river declined gradually to background levels 200 km downstream from the dam. Uniform depth distributions of MeHg and oxygen were encountered in the reservoir only during the rainy season, when vertical mixing was greatest and coincided with uniform MeHg concentrations along the river downstream from the dam. MeHg in plankton and total Hg concentrations in fish from downstream sites were higher than reservoir values, suggesting that MeHg exported from the dam was accumulated by biota. MeHg concentrations in both natural and impounded river systems were influenced by seasonality, with dissolved oxygen being the main predictor of variation. In tributaries of the Amazon river, changes in water level influence in the floodplain and in the limnological parameters, specially dissolved oxygen, and MeHg dynamics. In the Balbina reservoir, where the water level is manually controlled, the rainy and dry seasons control the limnology of reservoir, and, consequently, MeHg dynamics. The influence of the dam on MeHg concentrations decreases downstream, while the influence of the natural flood cycle increases.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVO GERAL.....	9
Objetivos específicos.....	9
CAPÍTULO 1 – Influence of the seasonal flood-pulse and water characteristics on methylmercury concentrations along the Amazon river and its tributaries.....	10
Abstract.....	12
Keywords.....	12
Introduction.....	13
Material and Methods.....	14
Study area.....	14
Sampling and analytical procedures.....	16
Statistical analysis.....	17
Results.....	17
Discussion.....	18
Conclusions.....	22
Acknowledgments.....	22
References.....	23
Tables.....	27
Figures.....	28
CAPÍTULO 2 – Reservoir stratification affects methylmercury levels in river water, plankton, and fish downstream from Balbina hydroelectric dam, Amazonas, Brazil.....	35
Abstract art.....	36
Abstract.....	37
Introduction.....	37
Material and Methods.....	39
Study area.....	39
Sampling and laboratory analyses.....	40

Results.....	43
Methylmercury in water and limnological conditions.....	43
Methylmercury levels in plankton.....	43
Total mercury in piscivorous fish.....	44
Discussion.....	45
Acknowledgments.....	49
Supporting information available.....	50
References.....	50
Figures.....	55
Supporting information.....	59
CAPÍTULO 3 – Revisão dos métodos de coleta, pré-tratamento, preservação e armazenamento de amostras de água para análise de mercúrio.....	60
Introdução.....	62
Frascos de coleta.....	63
Qual tipo de garrafa utilizar?.....	63
Como lavar as garrafas antes da coleta?.....	65
Procedimentos de coleta.....	68
Processamento da amostra após a coleta e sua preservação.....	71
MDG.....	72
Hg reativo.....	73
MeHg.....	73
HgT.....	74
Filtração.....	77
Controle de qualidade.....	79
Conclusão.....	81
Agradecimentos.....	81
Referências bibliográficas.....	82
Tabela.....	86
Figura.....	87
SÍNTESE.....	88

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
APÊNDICE A.....	106
APÊNDICE B.....	106
APÊNDICE C.....	106

Lista de tabelas

CAPÍTULO 1

Table 1. Mean±standard deviation of limnological parameters measured in high (n = 37) and low-water (n = 38) seasons in the Amazon main stem and its tributaries. *Indicates statistical difference.....27

Table 2. Loadings and eigenvalues of axes (PC1 and PC2) of principal component analysis for limnological parameters measured in the Amazon main stem and its tributaries.....27

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Vantagens e desvantagens da utilização de garrafas de vidro, politetrafluoretileno (PTFE) e politereftalato de etileno (PET) para a coleta e armazenamento de amostras de água destinadas às análises de diferentes espécies químicas mercuriais.....86

Lista de figuras

INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Diversidade de tipos de água dos ecossistemas aquáticos amazônicos (da esquerda para direita: água preta, clara e branca). Fotos: Daniele Kasper.....2
- Figura 2. Ambientes fluviais amazônicos durante a estação seca. Fotos: Daniele Kasper.....3
- Figura 3. Ambientes fluviais amazônicos durante a estação cheia. Fotos: Daniele Kasper.....3
- Figura 4. Laboratório de campo montado a bordo da embarcação utilizada durante as coletas; e laboratório de análises contendo o destilador de amostras de água e o aparelho MERX utilizados. Fotos: Daniele Kasper.6
- Figura 5. Quatro hidrelétricas construídas na região amazônica brasileira. Fotos: Daniele Kasper.....7

CAPÍTULO 1

- Figure 1. Sampling sites in the Amazon basin.....28
- Figure 2. Variation in the water level of the Negro, Solimões and Amazon rivers measured at the Manaus, Manacapuru and Jatuarana stations, respectively (data from ANA, 2013). Grey rectangles indicate sampling periods.....28
- Figure 3. Methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water collected in the Amazon main stem and its tributaries during high and low-water seasons in relation to % water level of the rivers ($r^2 = 0.528\%$; $p < 0.0001$). Percentage of water level (% water level) is the percentage of water level on the sampling day in relation to the highest water level recorded at local between July 2011 and December 2012 (sampling period).....29
- Figure 4. Principal component analysis of the limnological data of the Amazon main stem and its tributaries. Limnological parameters analyzed: pH, temperature (Temp), dissolved organic carbon (DOC), and dissolved oxygen (Oxy). The percentage of variance attributed to principal component axes (PC) in parentheses. High-water (black circles) and low-water (white circles) seasons.....29
- Figure 5. Partial correlation between methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water and limnological variables sampled in the Amazon main stem and its tributaries during high and low-water seasons (multiple regression: $F = 11.5$; $r^2 = 0.443$; $p < 0.0001$). DOC: dissolved organic carbon.....30
- Figure 6. Partial correlations between methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water and limnological variables sampled in the Amazon main stem and its tributaries during high-water season (multiple regression: $F = 5.51$; $r^2 = 0.524$; $p = 0.004$). DOC: dissolved organic carbon.....31

Figure 7. Partial correlations between methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water and limnological variables sampled in the Amazon main stem and its tributaries during low-water season (multiple regression: $F = 5.96$; $r^2 = 0.420$; $p = 0.001$). DOC: dissolved organic carbon.....32

Figure 8. Transport of methylmercury by the Negro river main stem and its main tributaries during the high and low-water seasons. The width of Negro river main stem and of the tributaries represents the amount of methylmercury transported. The export was calculated by multiplying of the discharge by the methylmercury concentrations in unfiltered water. River distance is related to Negro river main stem and starts in the most upstream sampling point (see details in Figure 1). *Discharge not measured.....33

Figure 9. Transport of methylmercury by the Amazon/Solimões main stem and its main tributaries during the high and low-water seasons. The width of Amazon/Solimões main stem and of the tributaries represents the amount of methylmercury transported. The export was calculated by multiplying of the discharge by the methylmercury concentrations in unfiltered water. River distance is related to Amazon/Solimões main stem and starts in the most upstream sampling point (see details in Figure 1). *Transport was $7788 \mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$, not plotted because it is out of scale.....34

CAPÍTULO 2

Figure 1. Sampling sites on the Balbina reservoir and the Uatumã river, downstream from the dam. Background image is L band SAR acquired by the JERS-1 satellite in 1995 (Nasda/MITI). Fish UP, DOWN₅ and DOWN₁₈₀ correspond, respectively, to the sampling sites for fish in the reservoir and in the Uatumã river, 5 and 180 km downstream from the dam.55

Figure 2. Seasonal variation in the vertical profiles of water quality parameters upstream from the Balbina dam (left) and in subsurface waters between 0.5 and 250 km downstream from the dam (right).....56

Figure 3. Seasonal and longitudinal variation in methylmercury levels in zooplankton collected with 70 and 350 μm mesh nets, refined according to Palermo,²² upstream and downstream from Balbina dam. Upstream value means and vertical bars when bigger than the symbols represent the standard deviation for triplicate samples.57

Figure 4. Total mercury levels in fish muscle (*Cichla* spp.) in relation to (a) fish standard length and (b) collection location. Locations include upstream from dam (UP) and 5 and 180 km downstream from Balbina dam (DOWN₅ and DOWN₁₈₀, respectively). Grey area represents selected fish based on its standard length (see text for details). These selected specimens are represented in (b), where black squares are the mean of THg levels, bars indicate 95% confidence intervals, and sampling sites that differ from each other at the significance level of 0.05 are presented with different letters (UP < DOWN₅ = DOWN₁₈₀)...58

Figure S1. Precipitation at Balbina reservoir (black continuous line) and water level of the Amazon river near the Uatumã's mouth (grey dashed line) along the sampling year. Grey arrows indicate the sampling periods.....59

CAPÍTULO 3

Figura 1. Resumo esquemático da metodologia que pode ser utilizada desde a coleta até o pré-processamento das amostras de água destinadas à análise das espécies químicas denominadas como mercúrio dissolvido gasoso (MDG), mercúrio reativo (Hg reativo), metilmercúrio (MeHg), mercúrio total (HgT) e o mercúrio associado ao material particulado ou dissolvido na água. Detalhes da metodologia são discutidos ao longo do texto.....87

INTRODUÇÃO GERAL

A região amazônica é caracterizada por extensos ecossistemas que ainda se encontram em condições prístinas. Atualmente, em poucas áreas do mundo é possível encontrar grandes rios e suas áreas de inundação em tal estado, limitando fortemente a interpretação de padrões e processos ecossistêmicos naturais. Assim, ecossistemas fluviais amazônicos permitem amplos estudos acerca dos ciclos biogeoquímicos naturais.

Considerando os sistemas aquáticos, percebemos que a diversidade da Amazônia, além de biológica, também é expressa na qualidade natural de suas águas. Sioli (1956) foi o pioneiro na classificação dos tipos de água amazônicos. Usando principalmente a cor da água e os parâmetros físicos e químicos, ele definiu três principais categorias: as águas brancas, pretas e claras (Figura 1). Os rios de águas brancas tem origem principalmente nos Andes e transportam grande carga de sólidos em suspensão, o que torna a coloração da água turva e resulta em baixa transparência da coluna d'água. Os valores de pH são próximos ao neutro e suas águas são ricas em nutrientes. Os rios Juruá, Madeira e Demeni são exemplos desta categoria. Os rios de águas pretas, como o Jaú e o Uatumã, tem concentração de nutrientes extremamente baixa, pH em geral mais ácido, e carregam uma pequena quantidade de sólidos em suspensão. A coloração de suas águas varia de verde escuro a marrom, devido à alta carga de substâncias húmicas transportada. Os rios de águas claras são transparentes, apresentam diferentes tonalidades de verde e carregam pequena carga de sólidos em suspensão e nutrientes. Os rios Tapajós e Trombetas são exemplos desta categoria de água.

Recentemente, com a disponibilidade de novas ferramentas de análise, e de dados espaciais e geoquímicos, Pereira (2011) demonstrou que as águas dos rios amazônicos variam continuamente em função das características naturais da bacia à montante. Assim, há um contínuo de características da água, e nem sempre conseguimos classificar com certeza a água de um rio dentro de uma das três categorias proposta por Sioli (1956).



Figura 1. Diversidade de tipos de água dos ecossistemas aquáticos amazônicos (da esquerda para direita: água preta, clara e branca). Fotos: Daniele Kasper.

A variação sazonal do nível da água é outra característica marcante dos sistemas fluviais amazônicos (Figuras 2 e 3). Os rios estão sujeitos a periódicos picos de vazão e inundação, uma dinâmica denominada pulso de inundação (Junk *et al.*, 1989). Os grandes rios amazônicos apresentam um pulso de inundação monomodal, com quatro estações hidrológicas distintas (enchente, cheia, vazante e seca). Durante a cheia, estima-se que a inundação atinja 15% da bacia (Melack e Hess, 2010). As mudanças de condições terrestres para aquáticas levam a alterações nos processos biogeoquímicos. Durante a inundação, há uma grande entrada de material orgânico alóctone no sistema aquático, o que, em geral, resulta em condições anóxicas na coluna d'água. Estas condições, associadas à alta diversidade natural da qualidade da água (p.ex., pH, turbidez, concentração de carbono dissolvido), e as extensas áreas preservadas, tornam os sistemas fluviais amazônicos uma área muito interessante para o estudo dos ciclos biogeoquímicos naturais.

Dentre os diversos ciclos biogeoquímicos estudados na região, o do mercúrio (Hg) sempre chamou a atenção dos pesquisadores devido ao uso intenso de mercúrio nos garimpos de ouro. O período de maior exploração das reservas de ouro ocorreu aproximadamente entre as décadas de 70 e 90, e é comumente chamado de corrida do ouro. Estima-se que nesta época, mais de 1.600.000 garimpeiros trabalhavam no Brasil (Pfeiffer e Lacerda, 1988). O mercúrio e o ouro formam uma liga metálica, o que permite separar o ouro fino das partículas de sedimento através de uma técnica barata e simples, e por isso foi amplamente aplicada pelos garimpeiros (Pfeiffer *et al.*, 1990). Essa atividade resultou no lançamento de cerca de 2.300 toneladas de mercúrio entre 1979 e 1994, somente no Brasil (Malm, 1998).



Figura 2. Ambientes fluviais amazônicos durante a estação seca. Fotos: Daniele Kasper.



Figura 3. Ambientes fluviais amazônicos durante a estação cheia. Fotos: Daniele Kasper.

Muitos estudos foram realizados na região amazônica a fim de avaliar o impacto da mineração do ouro sobre a biota, o ambiente e a população. Avaliações de peixes e sedimentos constataram maiores concentrações de Hg nas áreas das bacias hidrográficas com

atividade garimpeira, quando comparados àquelas distantes da atividade (Malm *et al.*, 1990; Padovani *et al.*, 1995). Além da contaminação do ambiente, em diversos estudos foi ressaltada a grande exposição ao metal pelas pessoas que trabalhavam com o ouro, desde sua extração até a venda, pois estes trabalhadores processavam a amálgama. Em áreas perto de lojas que vendiam ouro, foi observado que o ar e o solo eram mais contaminados por Hg do que em áreas urbanas distantes deste tipo de loja, o que indica que os vendedores de ouro estavam expostos ao Hg proveniente da queima das amálgamas realizado nas lojas (Malm *et al.*, 1995).

Estudos realizados nos últimos 15 anos mostraram que em muitos locais da bacia amazônica o mercúrio também pode estar presente naturalmente, demonstrando que os efeitos do garimpo podem ser localizados às regiões próximas a esta atividade (Lechler *et al.*, 2000). Maiores concentrações de Hg foram observadas em populações ribeirinhas da bacia do rio Negro, uma região remota, sem importantes relatos de atividades garimpeiras, quando comparadas àquelas das bacias do Tapajós e Madeira, com grande histórico de extração de ouro (Silva-Forsberg *et al.*, 1999). Na bacia do Tapajós estimou-se que 3% do mercúrio dos solos superficiais tenham origem nos garimpos e foram ali depositados via atmosfera (Roulet *et al.*, 1998). Os solos foram considerados a maior fonte de mercúrio na bacia do rio Negro, onde elevadas concentrações no ambiente foram observadas (Fadini e Jadim, 2001). Assim, além dos estudos que avaliam o impacto dos garimpos de ouro, é essencial compreender o ciclo natural do mercúrio na região, buscando entender em quais condições do sistema aquático este elemento encontra-se presente.

O ciclo do mercúrio é complexo e envolve reações de oxidação e redução nos ambientes aquáticos, terrestres e na atmosfera; podendo ser volatilizado, transportado, depositado, sofrer reações químicas, bioacumulado, adsorvido a partículas, dentre outros processos (WHO, 1991). O mercúrio emitido para a atmosfera na forma de Hg^0 pode ser oxidado a formas solúveis em água e precipitar com as chuvas (Munthe, 1992), ou pode ser adsorvido pelos aerossóis e ser depositado na forma seca (Mason *et al.*, 1994). Este pode então ser re-emitido para a atmosfera ou ser transportado até os ecossistemas aquáticos (WHO, 1991). Na água, pode estar na forma dissolvida ou formando complexos com espécies químicas dissolvidas ou materiais particulados (Mucci *et al.*, 1995). Este último pode decantar nos sedimentos ou ficar adsorvido às raízes submersas das macrófitas, que constituem alguns dos principais sítios de metilação (Benoit *et al.*, 1998; Guimarães *et al.*, 2000).

A taxa de metilação do mercúrio pode influenciar na bioacumulação do elemento uma vez que a concentração de metilmercúrio (MeHg) nos organismos aumenta com a concentração deste na coluna d'água (Watras *et al.*, 1998). O MeHg tem alta capacidade de incorporação pelas células e normalmente encontra-se ligado aos grupos sulfidríla das proteínas, agindo como inibidor e modificador das atividades proteicas (Neathery e Miller, 1975). Além de acumular nos organismos, o MeHg presente no ambiente pode ser biomagnificado, resultando em altas concentrações em organismos de topo de cadeia (Kasper *et al.*, 2007). Os peixes piscívoros, por exemplo, apresentam maiores concentrações de mercúrio quando comparados aos peixes de menor nível trófico (Palermo *et al.*, 2004; Kasper *et al.*, 2007).

Condições químicas e físicas do ambiente podem influenciar na especiação química dos elementos e, conseqüentemente, nos seus ciclos biogeoquímicos e acúmulo pela biota. Temperatura, pH, salinidade, concentração de carbono orgânico dissolvido e de oxigênio dissolvido são alguns parâmetros que podem influenciar no ciclo do Hg nos ecossistemas aquáticos (WHO, 1991; Watras *et al.*, 1998; Ikingura e Akagi, 2003; Amyot *et al.*, 2005). Estudos em rios temperados demonstraram que os parâmetros limnológicos são importantes controladores do transporte e da metilação do mercúrio (Balogh *et al.*, 2004; Brigham *et al.*, 2009; Bradley *et al.*, 2011). Na região amazônica, ainda não é claro quais são os parâmetros limnológicos que influenciam mais fortemente na dinâmica do mercúrio e se esta influência varia ao longo do ano.

Os estudos acerca do ciclo do mercúrio na região amazônica enfrentam dois problemas importantes: a complexa logística de campo; e concentrações naturais que podem ser muito baixas. A dificuldade em acessar certos ambientes de coleta muitas vezes impossibilita a realização de procedimentos analíticos *in situ*. Dependendo da espécie química que se quer avaliar, as amostras podem ter um curto prazo de validade; portanto, devem ser rapidamente transportadas para o local de análise (Figura 4). Matrizes que tem baixas concentrações de mercúrio em ambientes naturais (por exemplo, ar, água e material em suspensão na água) podem ser facilmente contaminadas nas condições de campo. Estas ainda exigem técnicas analíticas com baixo limite de detecção. O capítulo 3 apresenta uma revisão sobre os métodos utilizados nas análises de mercúrio em água. São discutidas as dificuldades de analisar este tipo de material no Brasil e alternativas metodológicas validadas que auxiliam no avanço deste tipo de pesquisa no país. Devido às inúmeras dificuldades metodológicas, estudos como este, avaliando as concentrações de metilmercúrio em águas naturais da Amazônia, são

escassos. Este é o primeiro trabalho que avalia as concentrações de metilmercúrio em rios da bacia Amazônica em uma escala geográfica tão ampla (mais detalhes Figura 1 do capítulo 1). Para este trabalho, amostras foram coletadas ao longo de cerca de 2.500 km entre os rios Solimões, Amazonas, Negro e seus tributários.

Laboratório de campo



Laboratório de análises



Figura 4. Laboratório de campo montado a bordo da embarcação utilizada durante as coletas; e laboratório de análises contendo o destilador de amostras de água e o aparelho MERX utilizados. Fotos: Daniele Kasper.

A grande disponibilidade de recursos naturais na Amazônia faz com que a região seja alvo de pressão para o uso destes recursos. Impactos como o desmatamento, a mineração e as hidrelétricas podem modificar diversos ciclos biogeoquímicos. As hidrelétricas merecem uma atenção especial, pois a região detém aproximadamente 2/3 do potencial hidrelétrico do Brasil (Bermann, 2002). As hidrelétricas produzem cerca de 20% da energia mundial (REN21, 2009) e 80% da energia utilizada no Brasil (Internationalrivers, 2013). Além das hidrelétricas já presentes na região amazônica, muitas vem sendo planejadas ou construídas (Figura 5). Portanto, entender o impacto das hidrelétricas sobre o ciclo do mercúrio se torna essencial para o planejamento destes empreendimentos na região.

A construção de represas na região amazônica causa, na maioria dos casos, a inundação de grandes áreas florestadas. A decomposição desta enorme carga de matéria

orgânica consome oxigênio dissolvido, o que resulta em condições hipóxicas ou anóxicas na coluna d'água e altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (Tundisi *et al.*, 1995). O déficit de oxigênio favorece a metilação do mercúrio e, conseqüentemente, a absorção deste pela biota (Huchabee *et al.*, 1979). As condições propícias à metilação (por exemplo, anoxia e alta atividade microbiana), associadas à grande lixiviação das margens recentemente inundadas, que mobilizam mercúrio e matéria orgânica dos solos inundados, fazem com que a biota dos reservatórios tenha um aumento nas concentrações de mercúrio logo após o seu enchimento (Morrison e Therien, 1995; Rogers *et al.*, 1995). Em geral, após alguns anos estas concentrações tendem a diminuir, podendo retornar aos níveis naturais (Verdon *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1995).

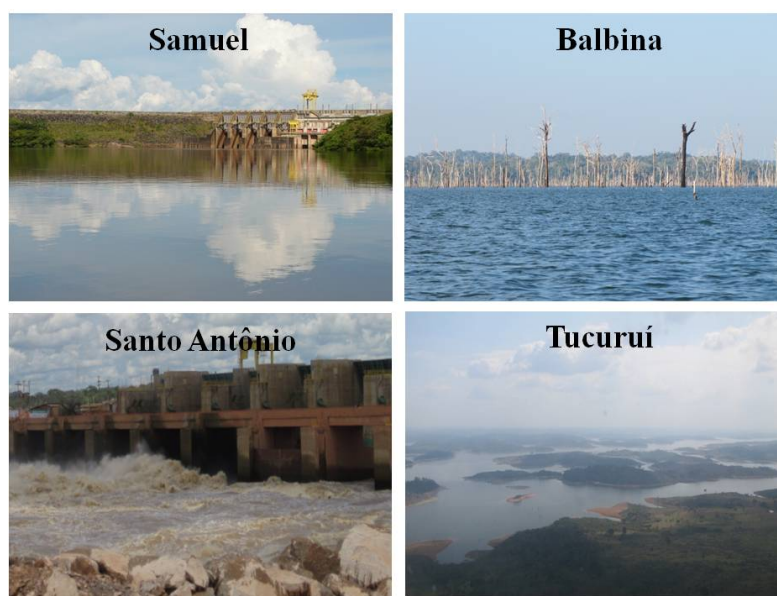


Figura 5. Quatro hidrelétricas construídas na região amazônica brasileira. Fotos: Daniele Kasper.

Quando a água passa através das turbinas para a geração de energia elétrica, transfere o metilmercúrio produzido no hipolímnio anóxico do reservatório para o rio à jusante da barragem (Canavan *et al.*, 2000). Este metilmercúrio está principalmente dissolvido na água ou associado ao material particulado em suspensão (Schetagne *et al.*, 2000; Dominique *et al.*, 2007), podendo ser incorporado pela biota e transferido através da cadeia alimentar à jusante.

Estudos recentes tem demonstrado que a biota abaixo das barragens pode ser mais contaminada do que aquela dos reservatórios. Os primeiros estudos com este enfoque foram realizados em reservatórios da região temperada (Schetagne *et al.*, 2000). Depois, foi observado que tal padrão também ocorre na região tropical, e, especificamente, em reservatórios amazônicos, como em Tucuruí (Palermo *et al.*, 2004), Petit-Saut (Dominique *et al.*, 2007) e Samuel (Kasper *et al.*, 2012). Um grande desafio ainda é compreender até qual distância à jusante estas elevadas concentrações ocorrem.

Esta tese é dividida em três capítulos. O primeiro aborda a sazonalidade e a diversidade das características limnológicas e sua influência sobre a presença do metilmercúrio na água de diferentes tributários da bacia amazônica. O segundo capítulo discute a sazonalidade na estratificação do reservatório de Balbina e sua influência sobre as concentrações de metilmercúrio em diferentes distâncias à jusante da barragem. O terceiro apresenta uma revisão das metodologias utilizadas para a análise de diferentes espécies químicas de mercúrio em água. São apresentadas as principais dificuldades metodológicas para a realização deste tipo de análise no Brasil, e métodos alternativos são discutidos. Pretende-se com este trabalho, preencher importantes lacunas para o conhecimento do ciclo do mercúrio na Amazônia.

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo investigar a dinâmica sazonal do metilmercúrio ao longo do rio Amazonas e seus principais tributários brasileiros e o impacto do represamento da hidrelétrica de Balbina sobre essa dinâmica.

Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a influência de parâmetros limnológicos sobre as concentrações de metilmercúrio da água ao longo do rio Amazonas e seus principais tributários brasileiros em duas estações hidrológicas distintas.
- ✓ Avaliar a influência do pulso de inundação sobre as concentrações de metilmercúrio da água ao longo do rio Amazonas e seus principais tributários brasileiros.
- ✓ Avaliar a influência da variação sazonal da estratificação do reservatório de Balbina sobre as concentrações de metilmercúrio do reservatório e do rio à jusante da barragem.
- ✓ Avaliar a influência do reservatório de Balbina sobre as concentrações de metilmercúrio da água superficial, plâncton e peixes ao longo do rio à jusante da barragem.

Capítulo 1

Kasper, D.; Forsberg, B.R.; Amaral, J.H.F.;
Py-Daniel, S.S.; Bastos, W.R. & Malm, O.
Influence of the seasonal flood-pulse and
water characteristics on methylmercury
concentrations along the Amazon river and
its tributaries. Manuscrito em preparação
para *Science of the Total Environment*.

Influence of the seasonal flood-pulse and water characteristics on methylmercury concentrations along the Amazon river and its tributaries

Daniele Kasper^{a*}, Bruce R. Forsberg^a, João H. F. Amaral^a, Sarah S. Py-Daniel^a, Wanderley R. Bastos^b, Olaf Malm^c

^aLaboratório de Ecossistemas Aquáticos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. Ephigênio Salles, 2239, Manaus, AM, 69060-020, Brazil

^bLaboratório de Biogeoquímica Ambiental Wolfgang Christian Pfeiffer, Universidade Federal de Rondônia, BR 364 km 9,6 sentido Acre, Porto Velho, RO, 76815-800, Brazil

^cLaboratório de Radioisótopos Eduardo Penna Franca, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil

* Corresponding author: kasperdani@yahoo.com.br; Phone/Fax +55 92 3643 1904
Laboratório de Ecossistemas Aquáticos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. Ephigênio Salles, 2239, Manaus, AM, 69060-020, Brazil

Abstract

Large Amazonian rivers are characterized by a monomodal flood-pulse, with distinct hydrological seasons. The alternation between terrestrial and aquatic phases in floodplain environments during this seasonal flood pulse leads to large variations in limnological conditions linked to mercury dynamics. During flooded, many inundated areas become anoxic promoting mercury methylation. At low-water, these areas become terrestrial, contributing less to MeHg production. These variable conditions, associated with a naturally high diversity of water quality (e.g., pH, organic carbon content) and a largely undisturbed fluvial ecosystem, make Amazonian rivers interesting sites for studying the natural mercury cycle. This study aimed to investigate the influence of the seasonal flood-pulse and associated limnological variations on methylmercury dynamics in the Amazon river system. We sampled 38 sites along the Amazon/Solimões and Negro main channels and their main tributaries in the Brazilian Amazon during two distinct phases of the flood-pulse cycle (high-water and low-water). Limnological conditions (pH, dissolved organic carbon, dissolved oxygen, water temperature) and water discharge were measured at each site. Unfiltered water was analyzed for methyl mercury (MeHg) by cold-vapor atomic fluorescence spectrometry. MeHg concentrations in water varied between 0.02 and 0.76 ng.L⁻¹, and increased with the water level of rivers ($r^2 = 0.528\%$; $p < 0.0001$). Different limnological parameters co-varied with MeHg concentrations depending on season; dissolved oxygen ($p = 0.094$) and pH ($p = 0.088$) during high-water season (multiple regression: $F = 5.51$; $r^2 = 0.524$; $p = 0.004$); water temperature ($p = 0.086$) and DOC ($p = 0.014$) during low-water season (multiple regression: $F = 5.96$; $r^2 = 0.420$; $p = 0.001$). Due to elevated MeHg concentrations and discharge, the export of MeHg by rivers was always substantially higher during high-water demonstrating the overwhelming importance of the seasonal flood pulse on MeHg dynamics in the Amazon river system.

Keywords

Methylation; Wetland; Bioaccumulation; Brazil; Negro river; Amazon river

Introduction

Mercury contamination in the Amazon has often been associated with gold mining activities. However, studies have shown that some Amazonian rivers have naturally elevated total mercury concentrations (Fadini and Jardim, 2001; Lechler et al., 2000; Silva-Forsberg et al., 1999), and that the impacts of anthropogenic mercury released from mining sites are relatively localized (Lechler et al., 2000). Atmospheric deposition of mercury from gold mining accounts for less than 3% of the total mercury present in Amazonian surface soils (Roulet et al., 1998). Considering the predominance of natural mercury in this system, the observed variations in mercury forms and concentrations can only be understood in the context of the regional mercury cycle.

Basin characteristics (wetland density) and limnological conditions (dissolved oxygen concentrations) have been shown to control mercury transport and methylation in north temperate rivers and streams (Balogh et al., 2004; Bradley et al., 2011; Brigham et al., 2009). In the Negro river, a black water tributary of Amazon, dissolved organic carbon (DOC) concentrations correlated positively with total mercury concentrations in fish (Belger and Forsberg, 2006) and hair of fish-eating riverine populations (Silva-Forsberg et al., 1999). However, Fadini and Jardim (2001) found a poor correlation between DOC and total mercury concentrations in the same river system. Higher mercury concentrations in Amazon-lake sediments were attributed to acidic pH conditions (Bisinoti et al., 2007) whereas total Hg-content of Amazonian fish were not influenced by pH (Barbosa et al., 2003).

In the Amazon basin, it is not clear which water parameters influence mercury dynamics and whether this influence varies during the year. This river system is ideal for studying the influence of water characteristics on mercury dynamics since it possesses a large natural diversity of surface water qualities. Amazon waters were originally classified as white, black and clear, based on color, physical and chemical parameters (Sioli, 1984). More recently, Pereira (2011) has shown that surface waters in the Amazon river system vary continuously as a function of differences in the natural landscapes of river catchments.

The limnological characteristics of large Amazonian rivers and alluvial wetlands can vary seasonally in response to the annual flood pulse (Junk, 1993). The Amazon main channel and its principal tributaries rise 8-12 meters during seasonal floods, inundating extensive alluvial floodplains. Thermal stratification of floodplain lakes, combined with large inputs of organic matter from flooded forests and macrophyte mats, results in anoxic conditions

especially conducive to mercury methylation. These alluvial wetlands together with hydromorphic soils, associated with interfluvial wetlands are important sites of mercury methylation and sources of methylmercury (MeHg) for aquatic ecosystems (Branfireun et al., 1996; Guimarães et al., 2000).

The balance between methylation and demethylation results in the observed environmental MeHg concentrations. It is important to know these concentrations and what conditions lead to their variation because MeHg is the principal form of mercury which bioaccumulates and biomagnifies in the aquatic food chain and, thus, represents a significant health risk for the fish eating riverine populations at the end of this chain.

This study assessed the influence of the annual flood pulse and associated variations in limnological characteristics on the concentration of MeHg in the Amazon main stem and its principal Brazilian tributaries. The high diversity of water quality (spatial and temporal), and relatively undisturbed nature of these systems, make Amazonian rivers ideal environments for investigating the natural variation in MeHg. This is also the first meso-scale study of MeHg dynamics in the world's largest river system. MeHg concentrations in all rivers were found to vary in direct correlation to river stage height, achieving the highest MeHg concentrations during high-water season. Different limnological parameters influenced MeHg concentrations depending on season; dissolved oxygen and pH during high-water season; water temperature and DOC during low-water season.

Material and Methods

Study area

The sample sites were located along the Amazon river main channel and its main Brazilian tributaries in the central Amazon basin (Figure 1). The studied rivers drain a region over three million km², nearly half of the entire Amazon basin. This extensive area contains a diversity of habitats, soil types and physico-chemical water conditions. The upland vegetation ranges from broad leaf evergreen rainforest to arid savanna. Alluvial wetland habitats include lakes, flooded forests, macrophyte beds and palm swamps. Interfluvial wetlands include wet savannas, campinarana woodlands and palm swamps. Lithology is also highly variable, ranging from recently exposed alluvial sediments to bleached white sands. The Andes has

freshly exposed sediments of marine origin, rich in salts, nutrients and secondary minerals that are carried by the waters of the rivers that drain this region. The central sedimentary basin is mainly covered by weathered fluvio-lacustrine sediments, and the rivers that flow by this region have low levels of salts, nutrients and dissolved minerals. These soils have been shown to have elevated concentrations of total mercury, presumably of atmospheric origin (Fadini and Jardim, 2001; Lechler et al., 2000; Roulet et al., 1998). The soil of Brazilian and Guyana shields originated from igneous rock poor in minerals and salts, therefore, those rivers flowing in this region have intermediary levels of nutrients, minerals and salts (Furch, 1984; Stallard, 1985; Stallard and Edmond, 1983). Physical and chemical characteristics vary continuously and substantially among Amazonian tributaries due to large differences in the geomorphological and biogeochemical properties of their upstream drainage-basin (Pereira, 2011).

Insert Figure 1.

The fluvial hydrology is characterized by a marked temporal variation due to periodic peaks in discharge and flooding, referred to as flood-pulses. The studied rivers show a monomodal flood-pulse, with four distinct hydrological seasons, rising-water, high-water, falling-water, and low-water (Figure 2). Peak flooding in the central part of the Amazon basin usually occurs in June, near the end of the six month rainy period (Junk, 1993). During high-water, it is estimated that 15% of the Amazon basin, predominantly river floodplains, is inundated (Melack and Hess, 2010).

Insert Figure 2.

The area of the Amazon basin studied is largely undisturbed, proving the opportunity to investigate the biogeochemistry of large rivers and their floodplains in their natural condition. However, there is a history of gold mining in the region, where mercury may have contaminated the environment and these activities varied considerably between the sub-basins studied here. There is little documented history of goldmining in the Negro basin, with the exception of the Branco sub-basin where significant mining occurred in the 80s and 90s. The Solimões basin has been relatively free of mining with the exception of the Traira region in the upper Japura river. The Madeira basin was an important gold mining region in the 80s and

90s. Significant levels of mining activity continue today in the Bolivia and Peru headwaters and in the lower Madeira.

Sampling and analytical procedures

River samples were collected during four expeditions between July 2011 and December 2012, including one low and one high-water excursion along the Negro river and one low and one high-water excursion along the Amazonas/Solimões river (Figures 1 and 2). We sampled seven sites along the Amazon/Solimões main stem (along approximately 1200 km) and at one site in each of its main tributaries (Jutaí, Juruá, Japurá, Purus, Madeira, and Uatumã rivers). The Negro river was sampled at four sites along its main stem (comprising approximately 700 km) and at one site in each of its 21 main tributaries (Figure 1). Subsurface water samples were collected near the center of each river channel for DOC and MeHg analyses, and limnological measurements (pH, dissolved oxygen, electric conductivity, and temperature) were made in situ at the same sites.

Water for MeHg analyses (250-500 mL) was collected in amber glass bottles with Teflon lids, and preserved by adding HCl and storing in a cool dark environment. All procedures followed the recommended ultra-clean techniques (EPA method 1669, 1996). MeHg analyses were conducted on unfiltered water following EPA method 1630 (2001), using a 1% APDC solution on distillation, ethylation and CVAFS (MERX, Brooks Rand). We analyzed each water sample in duplicate, and checked the accuracy by analyzing matrix spikes of MeHg (recovery of $97 \pm 12\%$; $n = 43$). The detection limit of MeHg was 0.012 ng.L^{-1} ; corresponding to the mean concentration of the method blanks plus three times the standard deviation of the blanks (Miller and Miller, 1994).

Water for DOC analyses were collected in 2 L polyethylene bottles. This water was filtered through pre-combusted ($450 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h) glass fiber filters (GF-1 Macherey Nagel; $0.7 \text{ }\mu\text{m}$ of retention capacity) and stored cool in pre-combusted glass scintillation vials with Teflon lined caps. We determined DOC concentrations with a total carbon analyzer (TOC-VPN, Shimadzu) which had an analytical precision of 0.01 mg.L^{-1} . At least three replicate injections were made for each sample, yielding average values with a coefficient of variation $< 2\%$.

Discharge measurements were done at all sites and sampling dates using an Acoustic Current Doppler Profiler (RD Inst., workhorse). When this was not possible, discharge data

were obtained from the nearest gaging station maintained by the Brazilian Agência Nacional de Águas (ANA, 2013). For 28 of the sampling sites which coincided with ANA gaging we also calculated the percentage of water level (% water level), which corresponds to the percentage of water level on the sampling day in relation to the highest water level recorded at the local between July 2011 and December 2012 (sampling period).

Statistical analysis

Linear regressions between % water level and MeHg concentrations were used to investigate the influence of the seasonal flood pulse on the MeHg dynamics. Principal Component Analysis, with correlation matrix, was used to investigate the seasonal variation in limnological variables (pH, dissolved oxygen, temperature, and DOC). Only those axes with eigenvalues higher than one were used. Differences between high and low-water seasons of all variables were tested by paired t or Wilcoxon tests.

Multiple linear regression was used to investigate the influence of pH, dissolved oxygen, temperature, and DOC on MeHg concentrations. Separate multiple linear regressions were also used to investigate seasonal differences in this relationship.

The transport of MeHg by tributaries (express as $\mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$) was calculated by multiplying the discharge ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) and MeHg concentration in water ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$). Analyses were conducted on R Development Core Team 2008. When necessary, data were log transformed (base of 10) to attend the assumptions of normality and homocedasticity.

Results

The MeHg concentrations in water increased with the % water level of rivers (Figure 3). Besides the MeHg concentrations, discharge was also higher in high-water season when compared with low-water. On the contrary, dissolved oxygen, temperature and pH were lower in high-water than low-water. DOC and conductivity had similar values between the two seasons (Table 1). The principal component analysis sorted the two seasons mainly by temperature and oxygen concentration of rivers (Figure 4; Table 2).

Insert Figures 3 and 4.

Insert Tables 1 and 2.

Considering both seasons together, the dissolved oxygen was negatively correlated to MeHg concentrations, whereas temperature, pH and DOC had no significant influence (Figure 5). During the high-water season, MeHg concentrations increased with pH, and decreased with dissolved oxygen concentrations (Figure 6). In the low-water season, MeHg concentrations increased with both water temperature and DOC (Figure 7).

Insert Figures 5, 6 and 7.

The transport of MeHg was higher in all rivers during the high-water season when compared with the low-water season (Figures 8 and 9; Table 1). Besides the difference seasonal, the amount of MeHg transported by the tributaries varied each other within each season. The Jutaí river collected in high-water was omitted from all statistical analyzes because its MeHg and oxygen concentrations in water were outliers that deflected the data analyses (MeHg: 0.76 ng.L^{-1} ; oxygen: 0.57 mg.L^{-1} ; water temperature: $26.9 \text{ }^\circ\text{C}$; pH: 5.29; electric conductivity: $7.13 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$).

Insert Figures 8 and 9.

Discussion

The highest methylmercury concentrations in rivers were observed at high water level, despite the greater discharge and diluting capacity of the rivers during this period. This apparently reflected a higher MeHg loading rate from the upstream drainage basin than that observed during low-water. In fact, during flooding there is more reactive mercury than in low-water season because mercury species are leached from the soil and carried to aquatic systems by runoff and flooding (Bisinoti, 2005). The greater availability of reactive mercury together with the occurrence of extensive flooded wetlands conducive to methylation promotes high levels of MeHg production at this time. Flooded forests and macrophyte mats are important sites of MeHg production which express this capacity soon after flooding (Guimarães et al., 2000). Waterlogged or hydromorphic soils have also been shown to be

important sources of MeHg for aquatic systems (Branfireun et al., 1996). Higher levels of MeHg production during high-water season apparently compensate the diluting effect of elevated discharge resulting in higher MeHg concentrations at this time.

In contrast to our results, Bisinoti et al. (2007) observed a decline in organic mercury concentrations during flooding in the Tarumã river, a tributary of the Negro, due apparently to the diluting effect of increased discharge. It is important to note that organic mercury and MeHg are not always synonymous. MeHg is mainly produced in aquatic environments by methylation, with only minor contributions from leaching of soils. Bisinoti et al. (2007) suggest that the leaching of labile mercury-organic matter complexes from the soil could increase the organic mercury amount in the Tarumã river, suggesting that the dynamics they observed was controlled by a different mechanism than that described here.

Dissolved oxygen and temperature were the water parameters which varied most between the two sampling seasons, but only oxygen was correlated with MeHg concentrations, explaining much of their variation along year. Dissolved oxygen has been shown to have an important influence on mercury dynamics in aquatic environments. Negative relationships have been observed between oxygen concentrations and MeHg contamination of the environment (e.g., Coquery et al., 2003) and total mercury contamination of the biota (e.g., Svobodová et al., 1999). Anoxic environments are commonly encountered in flooded habitats of the Amazon basin, and are especially conducive to MeHg production due to the presence of sulfate reducing bacteria, an important methylator of reactive mercury (Compeau and Bartha, 1985). Organisms capable of mercury methylation have been found among anaerobes, facultative anaerobes, and aerobes, but the potential for microbial methylation is generally thought to be higher under anaerobic conditions (reviewed by Ulrich et al., 2001).

MeHg produced in the anoxic zones of wetlands can gradually flow to rivers through connecting channels and over bank flow and this was presumably the principal source of MeHg in the river channels sampled here. The exceptionally high MeHg concentration encountered in the Jutuí river during the high-water season could reflect addition processes linked to a local “friagem” event. In the 48 hours preceding this sampling, there was a drop in average of air temperature, from 28 °C to 23.5 °C (INMET, 2013). This rapid but infrequent drop in temperature, locally called a “friagem” event, is known to promote the rapid destratification and vertical mixing of floodplains waters, resulting in the introduction of anoxic hypolimnetic waters rich in H₂S, NH₄, CH₄ and MeHg to the surface (Brinkman and Santos, 1974; Tundisi et al., 1984). The exceptionally low concentration of dissolved oxygen

(0.57 mg.L⁻¹) and high concentration of MeHg observed in the Jutaí river at this time, suggests that these anoxic floodplain waters were rapidly transported to the river channel. The exceptionally high concentrations of methane encountered in the Jutaí river at the time of our sampling support this hypothesis (Barbosa, 2013).

The concentration of dissolved oxygen was a good inverse predictor of MeHg concentrations particularly during the high-water season. This may reflect the association of methylating bacteria with anoxic floodplain environments and the exportation these waters to the river channel at high-water. It may also reflect seasonal variations in riverine oxygen concentrations linked to physical properties of the river channel (Devol et al., 1995) and the effect of these variations on MeHg dynamics. In anoxic or hypoxic conditions, slight changes in dissolved oxygen concentrations can significantly alter the balance between methylation and demethylation causing MeHg concentrations to vary.

Studies investigating the influence of pH on mercury methylation carried out in temperate region have shown greater methylation at lower pH (e.g., Borzongo et al., 1996; Miskimmin et al., 1992; Watras et al., 1996). In the Amazon, Silva-Forsberg et al. (1999) found a negative correlation between pH and the total Hg concentrations in the hair of fish-eating riverine populations of Negro basin. Higher mercury concentrations in Amazon-lake sediments were also attributed to acidic pH conditions (Bisinoti et al., 2007). These results for Amazonian aquatic systems suggest that methylation should be favored under acid conditions. In contrast, we found a positive relationship between pH and MeHg concentrations in the rivers studied here during the high-water season. A positive relationship was also observed between pH and total mercury concentrations in predatory fish (*Hoplias malabaricus*) collected in tributaries of the Negro river (Belger and Forsberg, 2006). These authors suggest that the relation between pH and mercury may be different in tropical ecosystems. In fact, Mauro et al. (1999) found that Hg methylation in *Eichhornia crassipes* roots increased with pH, reaching the highest levels between pH 6 and 7. Macrophyte beds have been shown to be important methylation sites in the Amazon due to the association of the periphyton and sulfate reducing bacteria to their roots (Achá et al., 2005; Guimarães et al., 2000; Mauro et al., 1999). These macrophyte beds are widely distributed along rivers and lakes during high-water. The influence of pH on MeHg concentrations only during high-water could be related to the availability of macrophytes as methylation sites during this period.

Temperature is an important factor controlling both methylation and demethylation (Ulrich et al., 2001). The positive relationship encountered between temperature and mercury methylation has been attributed to the higher rates of organic matter decomposition, primary

productivity, and microbial activity observed at moderately high temperatures (Matilainen and Verta, 1995; Mauro et al., 1999; Winfrey and Rudd, 1990). Whereas higher temperatures favor methylation, studies have also found that demethylation is favored by low temperatures (Ramlal et al., 1993). At high temperatures, the conjunction of both process leads to a large increase in MeHg levels. This is evident in temperate zone environments where the temperature range along the year is greater than that observed in tropical environments. Therefore, in temperate zone, high temperatures during summer are associated with elevated MeHg concentrations (Matilainen and Verta, 1995; Winfrey and Rudd, 1990). In the present study, there was a positive correlation between temperature and MeHg during the low-water season. However, this relationship was not observed at high-water nor when data from both seasons were analyzed together. The mechanism underlying the influence of temperature on MeHg concentrations in the Amazon river system remains unclear.

The interaction between mercury and DOC is widely discussed on literature, but still poorly understood. In the present study, DOC concentrations were similar between both periods, but only during low-water season did they correlate significantly with MeHg concentrations. Instead of concentration, this result could reflect the quality of organic carbon. The labile and aliphatic organic matter discharged into rivers by leaching of flooded soils during high-water season is more reactive to oxygen peroxide and could more efficiently scavenges oxidants compared to the DOC left in the water column during low-water season, which is more aromatic (Bisinoti, 2005; Jardim et al., 2010; Rodríguez Zúñiga, 2006). Therefore, at high-water a large scavenging of oxidants could occur due to the excess of labile DOC. At low-water, when labile DOC is scarce, an increase of DOC could result in increase scavenging of oxidants. Since MeHg could be degraded by oxidants, an increase of DOC at low-water could effectively protect MeHg from degradation, leaving higher concentrations of MeHg in the water column.

Since interactions between organic matter and mercury are complex other pathways may explain our results, such as the presence of competing ions in water, which can change the reactivity of DOC with mercury. Several studies have shown that mercury-DOC complexation is likely to dominate in oxic environments and that under anoxic conditions mercury dynamics is controlled by sulfide rather than DOC (Benoit et al., 2001; Dyrssen and Wedborg, 1991; Hurley et al., 1994). Therefore, the relationship between DOC and MeHg could be also influenced by interactions with sulfide, especially during high-water, when the oxygen concentrations were lowest.

We demonstrated that limnological parameters can influence on MeHg concentrations in water. Consequently, the rivers, which have different limnological conditions and discharge, presented different transport of MeHg each other. Comparing the two seasons, we observed that dissolved oxygen was the unique limnological parameter that always correlated negatively with MeHg levels, independently of the season, and discharge was substantially higher during high-water season. These resulted in highest transport of MeHg during high-water season at all sampling rivers, demonstrating the overwhelming influence of the seasonal flood pulse on mercury dynamics in this system by combined effect of flooding of wetlands and reduced oxygen concentrations.

Conclusions

This is the first meso-scale assessment of methylmercury dynamics in Amazonian rivers. The highest levels of methylmercury occurring during high-water season presumably derived from poorly oxygenated flooded alluvial wetlands (potential methylation sites) upstream from the sampling points. Within each season, the methylmercury concentrations of rivers were influenced by different limnological parameters since the chemical interactions that influence on mercury speciation differ at each season.

Acknowledgments

The authors thank the financial support of CNPq, FAPEAM, CAPES, INCT-INPeTAM/CNPq/MCT and logistical support of INPA and ICM-BIO/Parque Nacional do Jaú (license 27683-1). Thanks to João Rocha, Anderson Santos, Bruno Lima and Pedro Barbosa for assistance with fieldwork; Laboratório de Limnologia/UFRJ for assistance with DOC analyses; and the staff of Laboratório de Biogeoquímica Ambiental/UNIR and Laboratório de Radioisótopos/UFRJ for their help with mercury analyses.

References

- Achá D, Iñiguez V, Roulet M, Guimarães JRD, Luna R, Alanoca L, Sanchez S. Sulfate-reducing bacteria in floating macrophyte rhizospheres from an Amazonian floodplain lake in Bolivia and their association with Hg methylation. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:661–5.
- ANA. 2013. Agência Nacional de Águas: Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos. <http://www.ana.gov.br> (Electronic version accessed 25th August 2013).
- Balogh SJ, Nolley YH, Swain EB. Redox chemistry in Minnesota streams during episodes of increase methylmercury discharge. *Environ Sci Technol* 2004;38:4921–7.
- Barbosa AC, Souza J, Dórea JG, Jardim WF, Fadini PS. Mercury biomagnifications in a tropical black water, rio Negro, Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;45:235–46.
- Barbosa PM. Avaliação do fluxo difusivo de metano (CH₄) em ambientes do médio-baixo Solimões. Rio de Janeiro: UFRJ, Dissertation; 2013.
- Belger L, Forsberg BR. Factors controlling Hg levels in two predatory fish species in the Negro river basin, Brazilian Amazon. *Sci Total Environ* 2006;367:451–9.
- Benoit JM, Mason RP, Gilmour CC, Aiken GR. Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. *Geochim Cosmochim Acta* 2001;65:4445–51.
- Bisinoti MC. Biogeoquímica aquática do mercúrio orgânico na bacia do rio Negro, Amazônia. Campinas: UNICAMP, Thesis; 2005.
- Bisinoti MC, Júnior ES, Jardim WF. Seasonal behavior of mercury species in waters and sediments from the Negro river basin, Amazon, Brazil. *J Braz Chem Soc* 2007;18:544–53.
- Borzongu JCJ, Heim KJ, Chen Y, Lyons WB, Warwick JJ, Miller GC. Hg pathways in the Carson River–Lahontan reservoir system, Nevada, USA. *Environ Toxicol Chem* 1996;15:677–83.
- Bradley PM, Burns DA, Murray KR, Brigham ME, Button DT, Chasar LC, et al. Spatial and seasonal variability of dissolved methylmercury in two stream basins in the eastern United States. *Environ Sci Technol* 2011;45:2048–55.
- Branfireun BA, Heues A, Roulet NT. The hydrology and methylHg dynamics of Precambrian shield headwater peatland. *Water Resour Res* 1996;32:1785–94.

- Brigham ME, Wentz DA, Aiken GR, Krabbenhoft DP. Mercury cycling in stream ecosystems. 1. Water column chemistry and transport. *Environ Sci Technol* 2009;43:2720–5.
- Brinkman WLF, Santos UM. The emission of biogenic hydrogen sulfide from Amazonian floodplain lakes. *Tellus* 1974;26:261–7.
- Compeau G, Bartha R. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Appl Environ Microbiol* 1985;50:498–502.
- Coquery M, Cossa D, Peretyazhko T, Azemard S, Charlet L. Methylmercury formation in the anoxic waters of the Petit-Saut reservoir (French Guiana) and its spreading in the adjacent Sinnamary River. *J Phys IV* 2003;107:327–31.
- Devol AH, Forsberg BR, Richey JE, Pimentel TP. Seasonal variation in chemical distributions in the Amazon (Solimões) river: a multiyear time series. *Global Biogeochem Cy* 1995;9:307–28.
- Dyrssen D, Wedborg M. The sulfur–mercury (II) system in natural waters. *Water Air Soil Poll* 1991;56:507–19.
- EPA 1669 (U.S. Environmental Protection Agency, Method 1669). Sampling ambient water for trace metals at EPA water quality criteria levels. Washington; 1996.
- EPA 1630 (U.S. Environmental Protection Agency, Method 1630). Methyl mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS. Washington; 2001.
- Fadini PS, Jardim WF. Is the Negro river basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? *Sci Total Environ* 2001;275:71–82.
- Furch K. Water chemistry of the Amazon basin: the distribution of chemical elements among freshwater. In: Sioli H, editor. *The Amazon – limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dordrecht: Dr. Junk Publishers; 1984. p. 167–99.
- Guimarães JRD, Roulet M, Lucotte M, Mergler D. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. *Sci Total Environ* 2000; 261:91–98.
- Hurley JP, Krabbenhoft DP, Babiarz CL, Andren AW. Cycling of mercury across sediment–water interface in seepage lakes. In: Baker LA, editor. *Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs*. Washington: American Chemical Society Publishing; 1994. p. 425–49.
- INMET. 2013. Instituto Nacional de Meteorologia. <http://www.inmet.gov.br> (Electronic version accessed 20th August 2013).

- Jardim WF, Bisinoti MC, Fadini PS, Silva GS. Mercury redox chemistry in the Negro river basin, Amazon: the role of organic matter and solar light. *Aquat Geochem* 2010;16:267–78.
- Junk WJ. Wetlands of tropical South America. In: Whigham DF, Dykyjová D, Hejny S, editors. *Wetlands of the World I: inventory, ecology and management*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; 1993. p. 679–739.
- Lechler PJ, Miller JR, Lacerda LD, Vinson D, Bozongo JC, Lyons WB, et al. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira river basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *Sci Total Environ* 2000;260:87–96.
- Matilainen T, Verta M. Mercury methylation and demethylation in aerobic surface waters. *Can J Fish Aquat Sci* 1995;52:1597–1608.
- Mauro JBN, Guimarães JRD, Melamed R. Hg methylation in a tropical macrophyte: influence of abiotic parameters. *Appl Organomet Geochem* 1999;13:631–6.
- Melack JM, Hess LL. Remote sensing of the distribution and extent of wetlands in the Amazon basin. In: Junk WJ, Piedade M, Wittmann F, Schöngart J, Parolin P, editors. *Amazonian floodplain forests: ecophysiology, ecology, biodiversity and sustainable management*. New York: Springer Publishing; 2010. p. 43–59.
- Miller JC, Miller JN. *Statistics for Analytical Chemistry*. Great Britain: Ellis Horwood; 1994.
- Miskimmin BM, Rudd JWM, Kelly CA. Influence of dissolved organic carbon, pH and microbial respiration rates on Hg methylation and demethylation in lake water. *Can J Fish Aquat Sci* 1992;49:17–22.
- Pereira ELS. *Influência das características naturais da bacia de drenagem sobre as propriedades físico-químicas do rio Solimões/Amazonas e seus principais tributários brasileiros*. Manaus: INPA, Dissertation; 2011.
- Ramlal PS, Kelly CA, Rudd JWM, Furutani A. Sites of methylmercury production in remote Canadian Shield lakes. *Can J Fish Aquat Sci* 1993;50:972–9.
- Rodríguez Zúñiga UF. *Avaliação da influência de fatores ambientais na estrutura, dinâmica e propriedades ópticas das substâncias húmicas aquáticas do rio Negro*. São Paulo: USP, Dissertation; 2006.
- Roulet M, Lucotte M, Farella N, Serique G, Coelho H, Passos CJS, et al. Effects of recent human colonization on the presence of mercury in amazonian ecosystems. *Water Air Soil Poll* 1998;112:297–313.
- Silva-Forsberg MC, Forsberg BR, Zeidemann VK. Mercury contamination in humans linked to river chemistry in the Amazon basin. *Ambio* 1999;28:519–21.

- Sioli H. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses and river types. In: Sioli H, editor. *The Amazon – limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dordrecht: Dr. Junk Publishers; 1984. p. 127–65.
- Stallard RF. River chemistry, geology, geomorphology, and soils in the Amazon and Orinoco basins. In: Drever JI, editor. *The Chemistry of Weathering*. Boston: Dr. Reidel Publishers Co; 1985. p. 293–316.
- Stallard RF, Edmond JM. Geochemistry of the Amazon 2: the influence of geology and weathering environment on the dissolved load. *J Geophys Res* 1983;88:9671–88.
- Svobodová Z, Dusek L, Hejtmánek M, Vykusová B, Smíd R. Bioaccumulation of mercury in various fish species from Orlík and Kamýr reservoirs in the Czech Republic. *Ecotox Environ Safe* 1999;43:231–40.
- Tundisi JG, Forsberg BR, Devol AH, Zaret TM, Tundisi TM, Santos A, et al. Mixing patterns in Amazon lakes. *Hydrobiologia* 1984;108:3–15.
- Ulrich SM, Tanton TW, Abdrashitova SA. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Crit Rev Env Sci Tec* 2001;31:241–93.
- Watras CJ, Morrison KA, Back RC. Mass balance studies of Hg and methylHg in small temperate boreal lakes of the northern hemisphere. In: Baeyens W, Ebinghaus R, Vasiliev O, editors. *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher; 1996. p. 329–58.
- Winfrey MR, Rudd JWM. Environmental factors affecting the formation of methylmercury in low pH lakes. *Environ Toxicol Chem* 1990;9:853–69.

Tables

Table 1. Mean±standard deviation of limnological parameters measured in high (n = 37) and low-water (n = 38) seasons in the Amazon main stem and its tributaries. *Indicates statistical difference.

Water parameters	High-water^a	Low-water	Paired t or Wilcoxon test
[MeHg] in water (ng.L ⁻¹)	0.097±0.044	0.047±0.019	W = 532; p < 0.0001 *
Dissolved oxygen (mg.L ⁻¹)	2.74±1.26	6.36±0.52	t = 15.24; p < 0.0001 *
Water temperature (°C)	27.8±1.2	30.1±1.1	t = 10.02; p < 0.0001 *
pH	5.35±0.92	5.69±1.13	t = 3.75; p < 0.001 *
Dissolved organic carbon (mg.L ⁻¹)	7.28±3.13	8.00±4.79	t = 1.24; p = 0.22
Electric conductivity (μS.cm ⁻¹)	30.9±25.1	29.5±27.2	W = 144; p = 0.09
Water discharge (m ³ .s ⁻¹)	27491±44015	9901±18710	t = 3.90; p < 0.001 *
Transport of methylmercury (μg.s ⁻¹)	2930±5390	340±678	W = 579; p < 0.0001 *

^a All sampling sites, except Jutai river

Table 2. Loadings and eigenvalues of axes (PC1 and PC2) of principal component analysis for limnological parameters measured in the Amazon main stem and its tributaries.

Water parameters	PC1	PC2
Loadings		
Dissolved oxygen	0.49	-0.80
Water temperature	0.74	-0.55
pH	0.77	0.49
Dissolved organic carbon	-0.74	-0.57
Eigenvalues	1.93	1.52

Figures

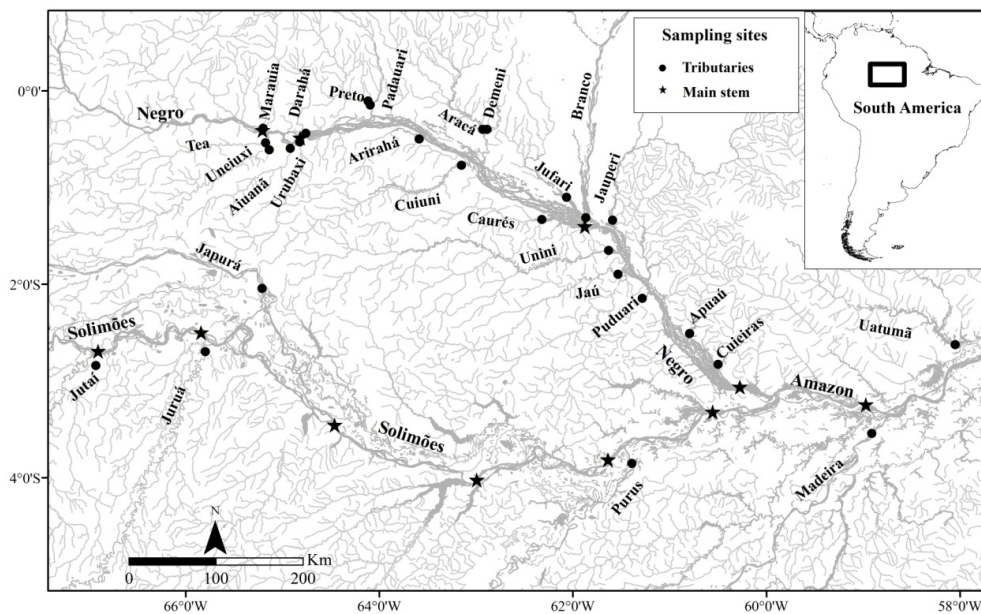


Figure 1. Sampling sites in the Amazon basin.

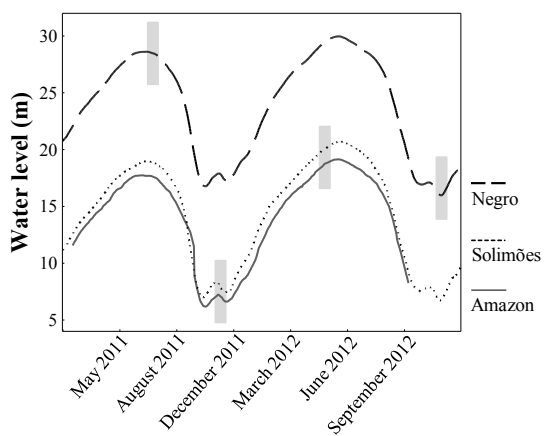


Figure 2. Variation in the water level of the Negro, Solimões and Amazon rivers measured at the Manaus, Manacapuru and Jatuarana stations, respectively (data from ANA, 2013). Grey rectangles indicate sampling periods.

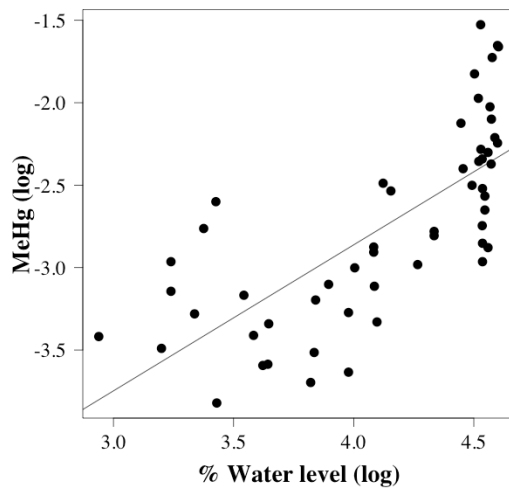


Figure 3. Methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water collected in the Amazon main stem and its tributaries during high and low-water seasons in relation to % water level of the rivers ($r^2 = 0.528\%$; $p < 0.0001$). Percentage of water level (% water level) is the percentage of water level on the sampling day in relation to the highest water level recorded at local between July 2011 and December 2012 (sampling period).

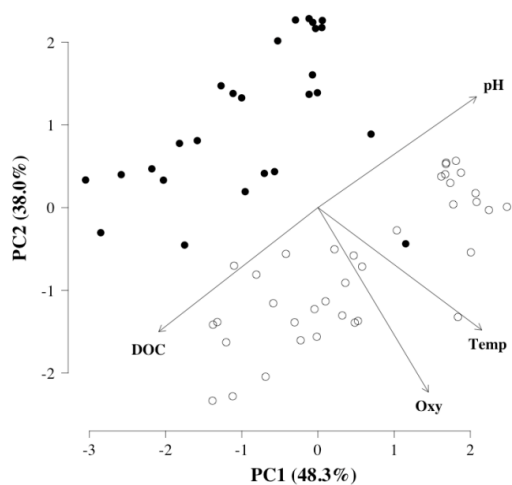


Figure 4. Principal component analysis of the limnological data of the Amazon main stem and its tributaries. Limnological parameters analyzed: pH, temperature (Temp), dissolved organic carbon (DOC), and dissolved oxygen (Oxy). The percentage of variance attributed to principal component axes (PC) in parentheses. High-water (black circles) and low-water (white circles) seasons.

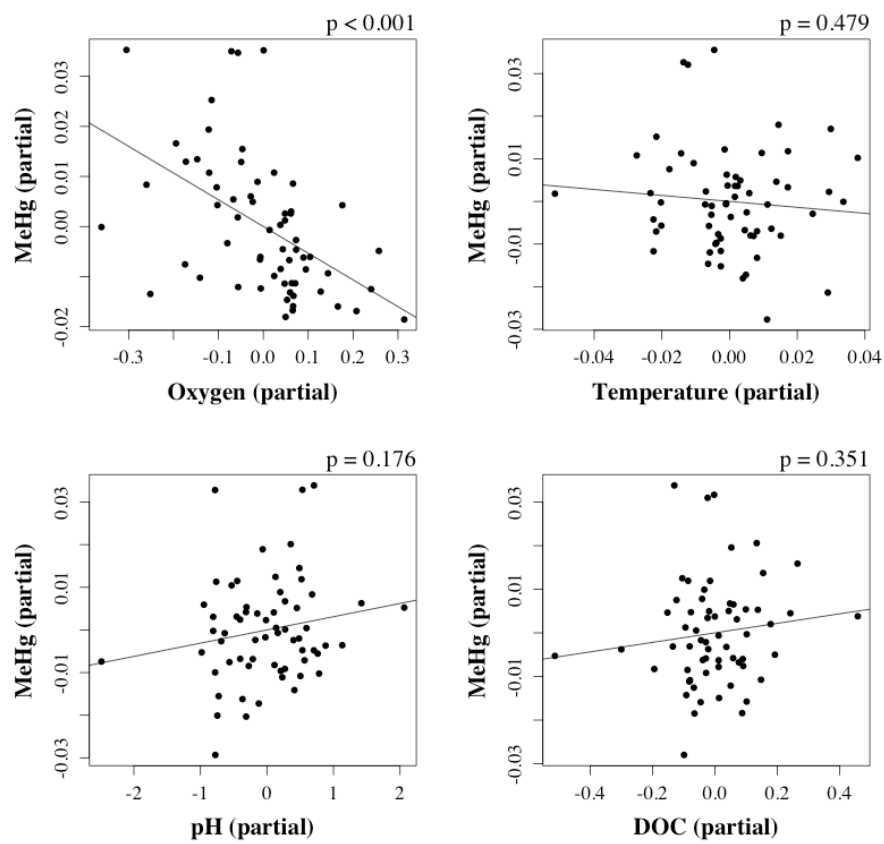


Figure 5. Partial correlation between methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water and limnological variables sampled in the Amazon main stem and its tributaries during high and low-water seasons (multiple regression: $F = 11.5$; $r^2 = 0.443$; $p < 0.0001$). DOC: dissolved organic carbon.

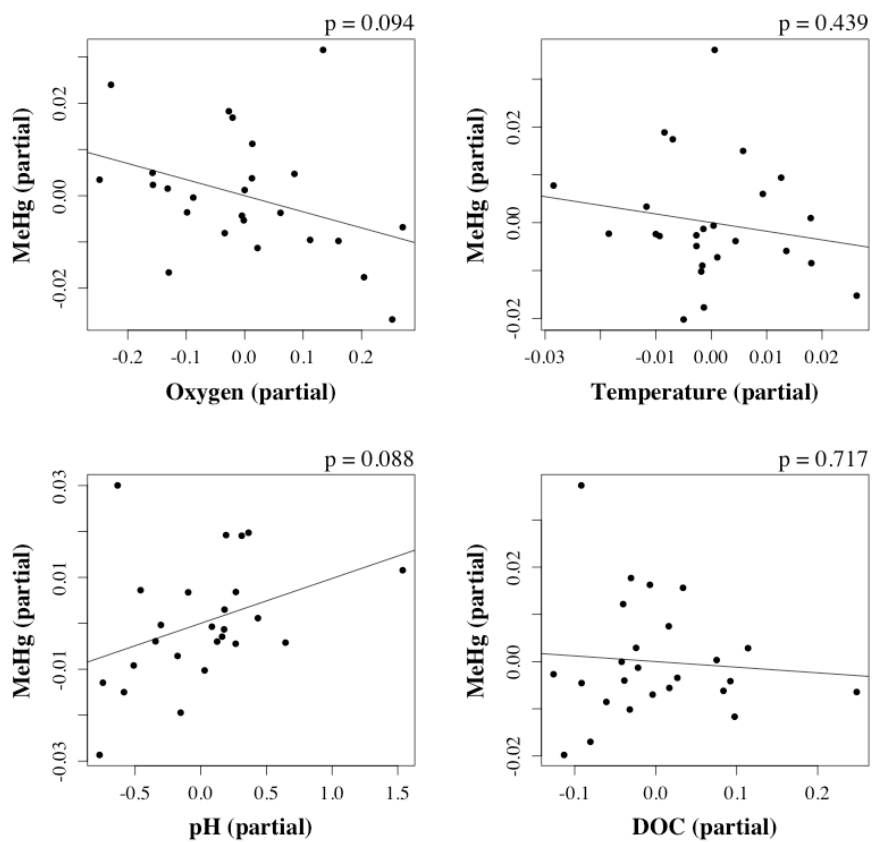


Figure 6. Partial correlations between methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water and limnological variables sampled in the Amazon main stem and its tributaries during high-water season (multiple regression: $F = 5.51$; $r^2 = 0.524$; $p = 0.004$). DOC: dissolved organic carbon.

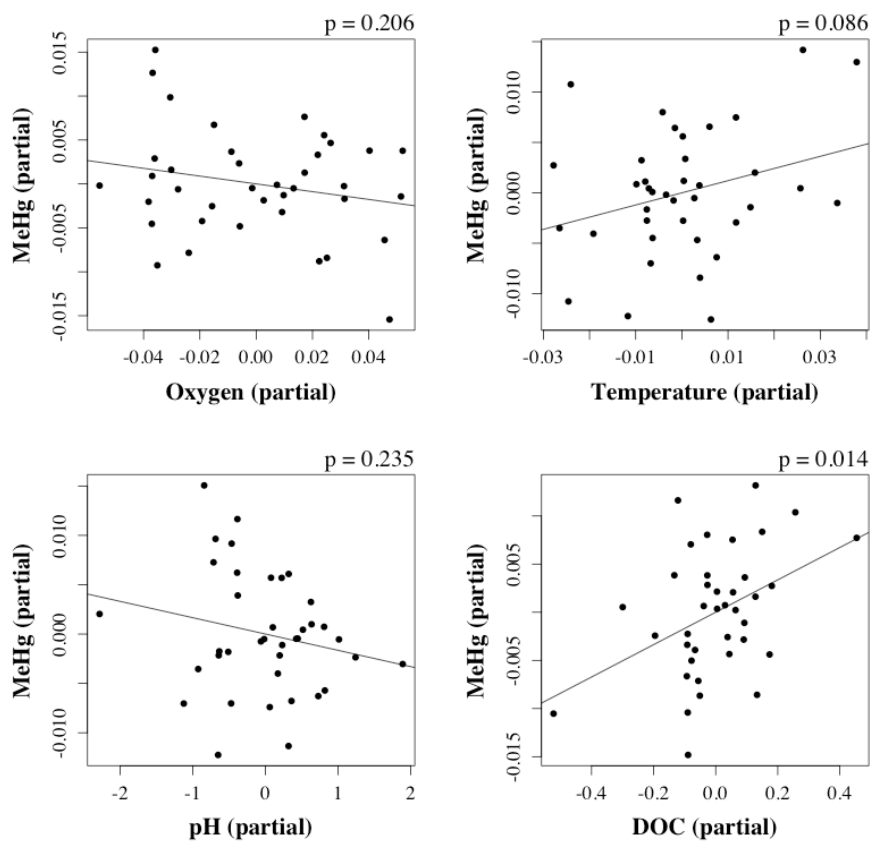


Figure 7. Partial correlations between methylmercury concentrations (MeHg) in unfiltered water and limnological variables sampled in the Amazon main stem and its tributaries during low-water season (multiple regression: $F = 5.96$; $r^2 = 0.420$; $p = 0.001$). DOC: dissolved organic carbon.

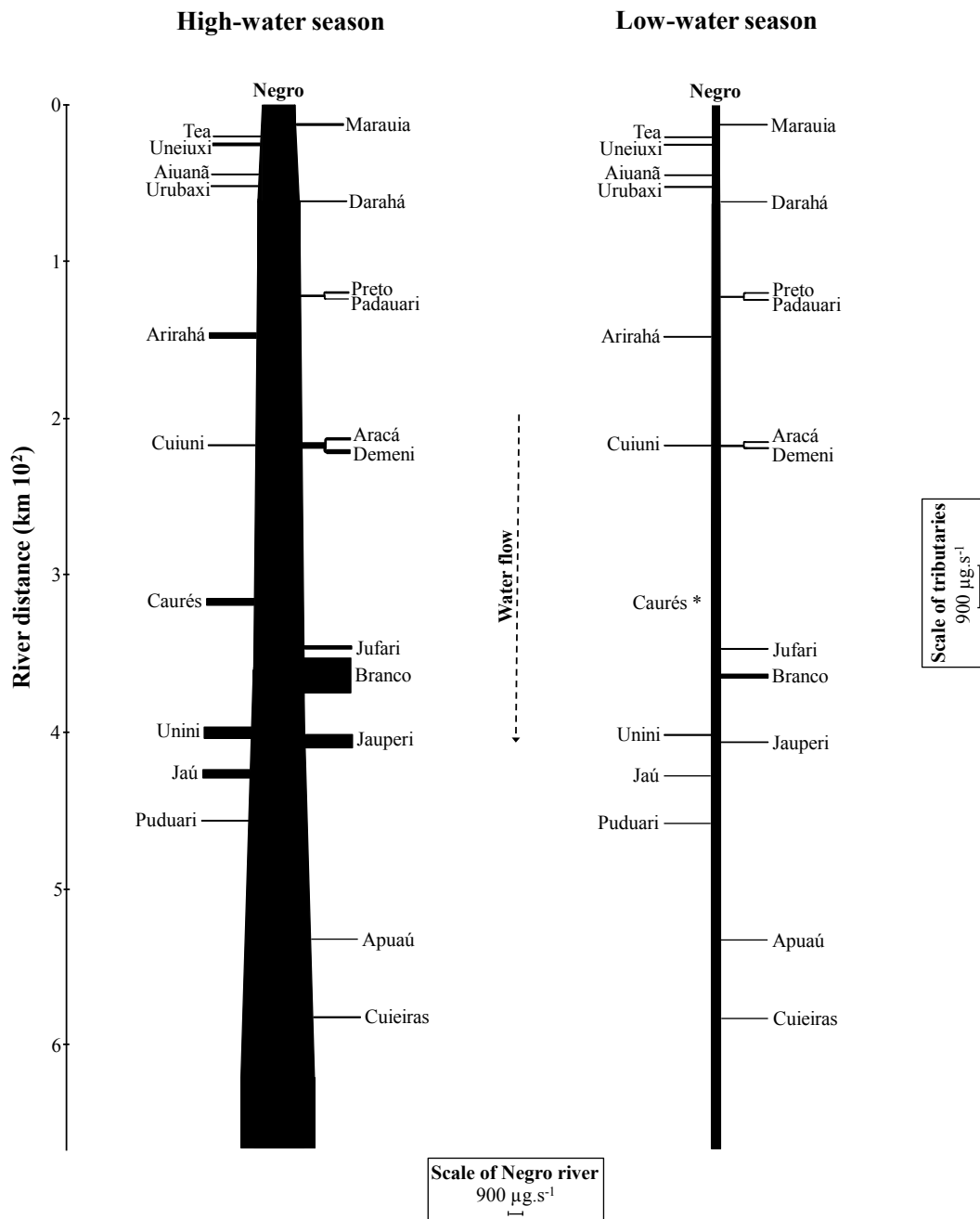


Figure 8. Transport of methylmercury by the Negro river main stem and its main tributaries during the high and low-water seasons. The width of Negro river main stem and of the tributaries represents the amount of methylmercury transported. The export was calculated by multiplying of the discharge by the methylmercury concentrations in unfiltered water. River distance is related to Negro river main stem and starts in the most upstream sampling point (see details in Figure 1). *Discharge not measured.

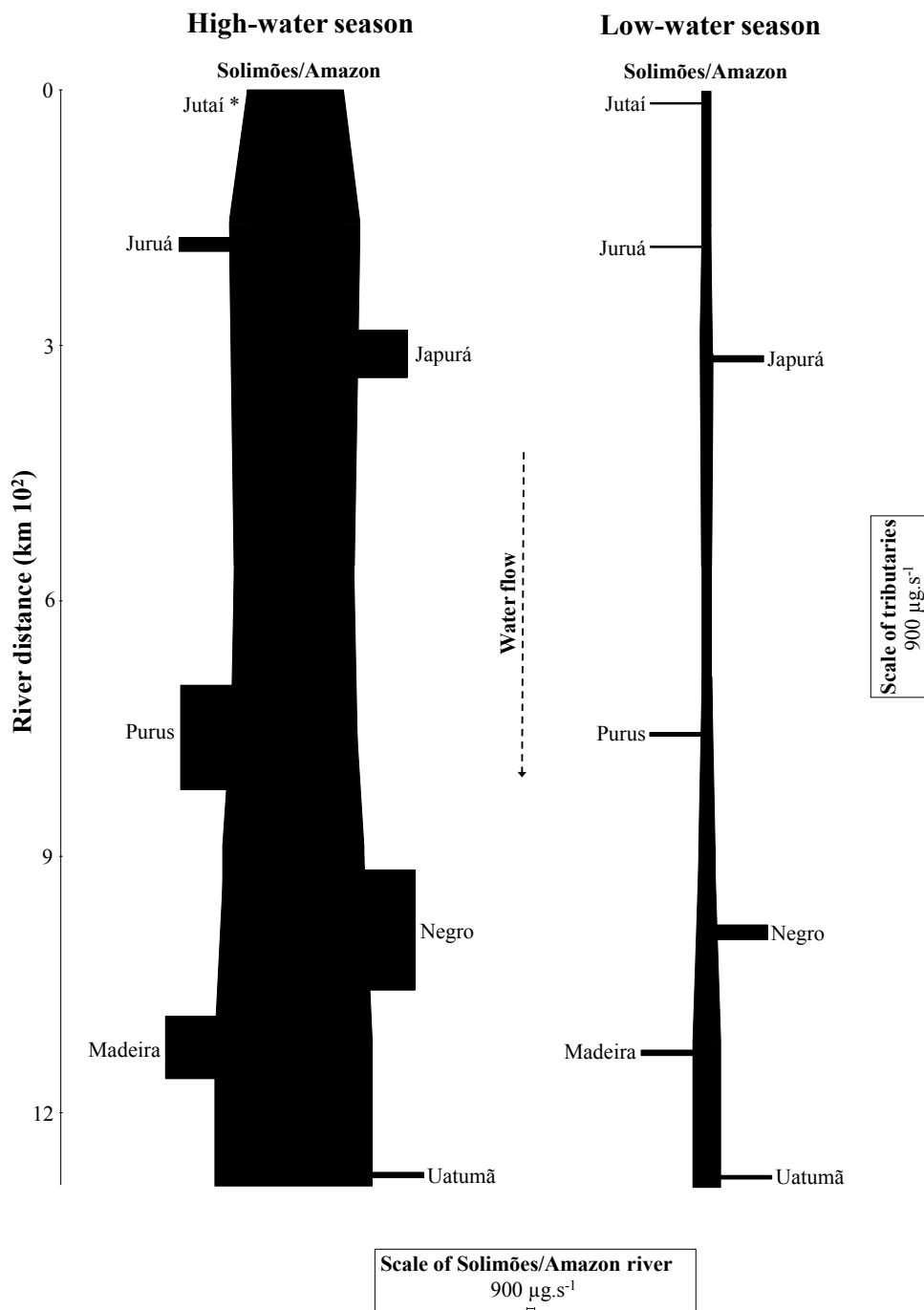


Figure 9. Transport of methylmercury by the Amazon/Solimões main stem and its main tributaries during the high and low-water seasons. The width of Amazon/Solimões main stem and of the tributaries represents the amount of methylmercury transported. The export was calculated by multiplying of the discharge by the methylmercury concentrations in unfiltered water. River distance is related to Amazon/Solimões main stem and starts in the most upstream sampling point (see details in Figure 1). *Transport was $7788 \mu\text{g}\cdot\text{s}^{-1}$, not plotted because it is out of scale.

Capítulo 2

Kasper, D.; Forsberg, B.R.; Amaral, J.H.F.;
Leitão, R.P.; Py-Daniel, S.S.; Bastos, W.R.
& Malm, O. 2014. Reservoir Stratification
Affects Methylmercury Levels in River
Water, Plankton, and Fish Downstream from
Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas,
Brazil. *Environmental Science & Technology*
48:1032-1040

Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil

Daniele Kasper^{1*}, Bruce R. Forsberg¹, João H. F. Amaral¹, Rafael P. Leitão¹, Sarah S. Py-Daniel¹, Wanderley R. Bastos², Olaf Malm³

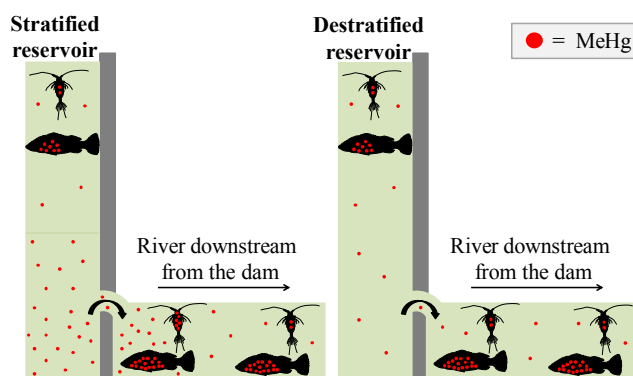
¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil

²Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

³Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* Corresponding author: kasperdani@yahoo.com.br; Phone/Fax +55 92 3643 1904

Abstract art



Abstract

The river downstream from a dam can be more contaminated by mercury than the reservoir itself. However, it is not clear how far the contamination occurs downstream. We investigated the seasonal variation of methylmercury levels in Balbina reservoir and how they correlated with the levels encountered downstream from the dam. Water, plankton and fishes were collected upstream and at sites between 0.5 and 250 km downstream from the dam during four expeditions in 2011/2012. Variations in thermal stratification of the reservoir influenced the methylmercury levels in the reservoir and in the river downstream. Uniform depth distributions of methylmercury and oxygen, encountered in the poorly stratified reservoir during the rainy season collections, coincided with uniformly low methylmercury levels along the river downstream from the dam. During dry season collections, the reservoir was strongly stratified and anoxic hypolimnion water with high methylmercury levels was exported downstream. Methylmercury levels declined gradually to 200 km downstream. In general, the methylmercury levels in plankton and fishes downstream from the dam were higher than those upstream. Higher methylmercury levels observed 200-250 km downstream from the dam during flooding season campaigns may reflect the greater inflow from tributaries and flooding of natural wetlands which occurred at this time.

Introduction

The impoundment of rivers for hydroelectric power generation can cause a series of impact, including local extinction of species, increased greenhouse gases emissions, eutrophication, and increased mercury concentrations in aquatic biota.¹⁻³ These changes occur due to the conversion of terrestrial ecosystems and a flowing river into a large reservoir-lake that can become stratified seasonally, where large amounts of organic matter, nutrients and trace elements are released from decaying terrestrial vegetation and soils to the water column. The anoxic environments produced under these conditions are especially favorable for the methylation and bioaccumulation of mercury in the reservoir food chain.^{2,4} Recent studies have shown that river impoundment can often have greater effects on the downstream river ecosystem than on the reservoir itself. With regards to mercury, the levels encountered in

surface waters⁴ and fish^{5,6} have generally been found to be higher downstream from reservoir dams than upstream.

The high amounts of methylmercury (MeHg) downstream from dams can be attributed to reservoir stratification which increases anoxia in hypolimnetic waters and favors mercury methylation and MeHg bioaccumulation.^{2,4} The release of hypolimnetic waters through turbines below dams, increases MeHg availability downstream⁴ and promotes its bioaccumulation and biomagnification through the aquatic food web.⁵ Studies have shown that this dynamics can vary seasonally with the stratification-destratification pattern of the reservoir, with high MeHg in the reservoir hypolimnion and downstream river waters during stratification periods, and decreased methylmercury levels in hypolimnetic and downstream river waters during destratification periods.^{4,7} Fish (*Curimata cyprinoides*) living downstream from the Petit-Saut reservoir (Amazon region), which fed on organic matter and microorganisms derived from the reservoir's anoxic hypolimnion, were found to have 10-fold higher mercury levels than those living in the reservoir, showing a clear link between MeHg export and downstream contamination.⁸ Fishes located downstream from the dams can also have higher mercury levels due to changes in feeding habit.^{2,6} Omnivorous fish downstream from the Tucuruí reservoir (Brazilian Amazon) had higher mercury concentrations and trophic levels than those upstream from the dam.⁶ In the Robert-Bourassa reservoir (Canada), benthic feeding fish became piscivorous downstream from the dam, resulting in higher mercury levels.²

Most studies on mercury contamination downstream from reservoirs have focused on the regions immediately below the dams,^{5,6,8,9} without considering the variation in mercury levels further downstream. Reservoir effects on mercury levels were observed in water collected 22 km downstream,⁴ and in fish located up to 275 km downstream from the Robert-Bourassa reservoir² and over 300 km downstream from the Smallwood reservoir.¹⁰ In an <1 year-old Chinese reservoir, there was no clear pattern of total mercury levels in water and plankton in the river along around 100 km downstream from the dam.¹¹ The geomorphological and limnological characteristics of a river are important to consider when evaluating the impacts of hydroelectric dams, since the river interacts with the water released from the reservoir. Schetagne and Verdon² suggest that the distance downstream from a dam at which fish mercury levels increase depends on the extent of dilution from tributaries along the reach, and the presence of large bodies of water (lakes or reservoirs), permitting the sedimentation of mercury-rich material. However, high mercury levels persisted in fish far below the Smallwood reservoir-dam, even after the river passed through two large lakes.¹⁰

This author suggest that habitat use and prey preferences of fish can also influence on the extent of the dam-effect on mercury levels. In fact, studies in the Samuel⁵ and Lago Manso¹² reservoirs suggest that fishes feeding on allochthonous food show little or no effect of the dam on their mercury levels since most of their food is not derived from the contaminated river system. The inflow of tributaries downstream from the Petit-Saut reservoir contributed reactive mercury that was methylated in the Sinnamary river, resulting in greater MeHg transport downstream from the dam.¹³ Fluvial wetlands, naturally present in the Amazonian basin, can also be an important site for methylation,¹⁴ contributing significant amounts of MeHg to the river system. Thus many physical, chemical and biological factors must be considered when assessing the downstream impacts of dams. The scarcity of data on the mercury levels in river waters and biota, especially plankton, far below reservoirs has limited our understanding of the dam-effect. We present here the results of an investigation of the variation in methylmercury contamination along a 250 km reach of the Uatumã river downstream from Balbina, a tropical hydroelectric reservoir in the Central Brazilian Amazon.

The specific objectives of the study were: (i) to investigate the influence of seasonal variation in thermal stratification above the dam on the levels of methylmercury in the reservoir and in the river downstream, and (ii) to investigate the influence of the reservoir on methylmercury levels in surface water, plankton and fish along the extended downstream study reach. This is the first study which simultaneously considers the combined effect of a reservoir on all of these components.

Materials and Methods

Study area

The Balbina reservoir (01° 52' S; 59° 30' W) was formed in 1987 by damming the Uatumã river in the central Amazon basin. The climate in the region is tropical humid, with annual rainfall of 2000 mm, concentrated between December and May. The precipitation along the sampling year is showed in Figure S1. The average flooded area of the reservoir-lake is 2400 km² and the hydraulic residence time is about 14 months.¹⁵ The water level of the reservoir-lake is controlled to maximize the power generation, and varied from 21-24 m (depth immediately upstream from the dam) during the study period. Previous studies

monitoring the reservoir monthly (1989-1999)¹⁶ and bimonthly (2004-2005)³ showed that the reservoir is thermally stratified most of the year resulting in the development of anoxia in bottom waters, except in March-May when there is a more oxygenated homogeneous water column due to weakened thermal stratification during the rainy season. The water removed for power generation is drawn through a grating that begins at an average depth of 14 m and extends to the bottom,³ entirely below the oxycline in most cases, which means that the characteristics of downstream waters are strongly influenced by seasonal stratification dynamics in the reservoir. All water used for power generation, leaves through the turbines, even during the rainy season, and the spillways are opened only rarely during unusual rains. Immediately downstream from the dam, the Uatumã river passes through a narrow valley in the Guyana Shield. It has a narrow floodplain in this region (0-400 m) and no significant interfluvial wetland in its drainage, with water levels varying rapidly within narrow limits in response to reservoir management¹⁷ (depth: 6±2 m). In contrast, the lower stretch of the river flows through the central Amazon sedimentary basin, characterized by a flat topography with extensive alluvial floodplains. The floodplain of the Uatumã is much broader in this reach (1-6 km) and is inundated by a strong seasonal flood pulse (depth: 1-9 m), with high water levels occurring from April to June (Figure S1). The flood dynamics in this region is a backwater effect linked to the annual flood pulse of the Amazon river main channel.

The reservoir is surrounded mainly by natural broadleaf tropical forest areas, with some small communities and the village of Balbina. The left margin of the reservoir is occupied by the ReBio do Uatumã nature reserve which encompasses 9387 km² of the drainage basin. There is no gold mining in the Uatumã basin.

Sampling and laboratory analyses

Samples were collected during four expeditions (Figure S1) to account for the major variations in the water chemical characteristics that are linked to the seasonal rainfall pattern.^{3,16} Campaigns took place in 30th August-10th September 2011 (dry season), 17-21th December 2011 (early wet season), 31th March-4th April 2012 (wet season) and 27th June-2nd July 2012 (early dry season), designated as August 2011, December 2011, March 2012 and June 2012, respectively. In the lower stretch of the Uatumã, these campaigns reflected the two flood phases (high and low water).

Water samples for MeHg analyses were collected in the four expeditions and limnological measurements (pH, dissolved oxygen, electric conductivity, and temperature) were made at the same times and sites. We sampled water along a vertical profile immediately upstream from the dam at approximately 3 m depth intervals using a Van Dorn bottle. Downstream from the dam, subsurface water (0.3 m depth) was collected in the center of Uatumã channel at a point equidistant from the riversides. The samples were taken at six locations along the river between 0.5 and 250 km downstream from the dam (hydrological distance). Using ultra-clean techniques,¹⁸ we collected 250-500 mL water samples in amber glass bottles with teflon lids. The sample bottles were cleaned according to EPA 1630;¹⁹ briefly, the bottles were filled with sequential solutions of ultra pure water with HCl and heating for several hours. Between each cleaning step, the bottles were rinsed three times with ultra pure water. Finally, the bottles were double-bagged in polyethylene zip-type bags. Bottle and field blanks were used to evaluate contamination.¹⁹ The samples were preserved by adding HCl a few hours after collection, and storing in a cool dark environment.¹⁹ Field duplicate were collected to assess the precision of the field sampling.¹⁹ MeHg analyses were conducted on unfiltered water following EPA method 1630,¹⁹ using 1% APDC solution on distillation, ethylation and CVAFS (MERX, Brooks Rand). We analyzed each water sample in duplicate, and checked the accuracy by analyses of matrix spikes of MeHg (spiked 2-30 h before analyses) with true concentration¹⁹ ranging between 0.02-0.55 ng.L⁻¹ (recovery: 97±12%; n=43). The detection limit of MeHg was 0.012 ng.L⁻¹, corresponding to the mean of concentrations of the method blanks plus three times the standard deviation of the blanks.²⁰ In an analytical intercalibration performed for MeHg analysis in water, our laboratory's performance was considered satisfactory.²¹

We collected plankton at the same time water samples were taken, except in the first campaign, when the plankton was not collected. We sampled plankton at three sites near the dam in the reservoir-lake and at 5, 35, 200 and 250 km downstream from the dam (Figure 1). At each site, conical plankton nets of 70 and 350 µm mesh size were hauled horizontally just below the water surface. Both nets collect mainly zooplankton due to the large mesh, however, some net algae could be included in those filtered materials. In order to obtain a more pure zooplankton sample, the filtered material was separated into phytoplankton and zooplankton according to the methodology described in Palermo.²² Briefly, immediately after collection, we transferred each sample to a decantation funnel, and added around 500 mL of carbonated mineral water. After 30 min, the zooplankton become narcotized, sank to the bottom of the funnel and was decanted while the phytoplankton remained suspended allowing

the sequential collection of both materials. As expected, suspended material (phytoplankton) was scarce since these mesh-nets collect mainly zooplankton, not holding much of phytoplankton which is generally smaller. Therefore, phytoplankton was disregarded and we determined methylmercury levels only in zooplankton. These separations are not always perfect since it is rough separation method, in which the plankton is not separated cell by cell, and some algae were probably included in the zooplankton samples. However, Palermo²² considered this method adequate for plankton separation. Phytoplankton remains could decrease the MeHg levels observed in the zooplankton samples since phytoplankton generally has lower MeHg than zooplankton.

Zooplankton samples were stored at -18 °C, freeze-dried and analyzed for MeHg content according Almeida,²³ using 25% KOH/Methanol solution, ethylation and CVAFS (MERX, Brooks Rand). We analyzed each sample in duplicate whenever possible (some samples had low mass). The recoveries of certified reference samples were 81±5% (IAEA-142; n=6), 80±2% (DORM-3; n=4), 97±3% (IAEA-140; n=2) and 83±4% (IAEA-405; n=3). The minimum detectable concentration was 0.29 µg.kg⁻¹.

Piscivorous fishes (*Cichla* spp.) were captured in the reservoir (UP; n=37) and in the Uatumã river, 5 km (DOWN₅; n=21) and 180 km downstream from the dam (DOWN₁₈₀; n=36) between September and December 2011 (Figure 1). Were selected only adult individuals, based on the length of first gonadal maturation.^{24,25} Hg levels in fishes, particularly in muscle, are integrated over longer time periods than plankton. Therefore, the results for fish are considered to be representative of the entire sampling period. We determined total mercury levels (THg) on fresh skinless dorsal muscle (located above the lateral line) by hot acid extraction and CVAAS-FIMS (FIMS 400, Perkin Elmer) following Bastos et al.²⁶ We analyzed samples in duplicate and in parallel with certified material (DORM-3 recovery: 99±5%; n=3) as well as standard samples produced in the laboratory and used in intercalibration exercises among Brazilian laboratories (AFPX-5130 recovery: 109±3%; n=5). The minimum detectable concentration was 4 µg.kg⁻¹. Kehrig et al.²⁷ analyzed methylmercury levels in muscle of *Cichla* spp. from the Balbina reservoir and found that, on average, 96±4% of the total mercury was methylmercury. Therefore, in the following results and discussion, we consider that almost all THg content in fish was MeHg.

The mercury concentrations presented here for water, plankton and fish samples represent the direct analytical results uncorrected for the observed recoveries of the spikes and certified reference materials.

Results

Methylmercury in water and limnological conditions

The reservoir was stratified throughout the sampling campaigns, except in March 2012, with anoxic conditions prevailing at depths below 15 m (Figure 2). The level of vertical stratification was evaluated during each sampling campaign by monitoring profiles of temperature and oxygen during at least 48 h at 2-10 h intervals (data not shown). The MeHg levels in anoxic hypolimnetic waters (0.33 ng.L^{-1} , on average) were higher than those at near the surface ($<0.02 \text{ ng.L}^{-1}$). When the water column was well stratified, the temperature decreased with depth and electrical conductivity increased (subsurface-bottom waters: 31.5 ± 0.7 - $28.8 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$; 8.2 ± 0.3 - $32.2 \pm 8.3 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$). Methylmercury levels decreased along the river downstream from the dam in August and December 2011, the low water period in the lower reach of the Uatumã (August: 0.18 - 0.06 ; December: 0.11 - 0.03 ng. L^{-1} ; respectively at 0.5 - 250 km downstream). In July 2011, the high-water season, MeHg levels decreased from 0.5 to 200 km downstream (0.12 to 0.06 ng. L^{-1} , respectively), but then increased at 250 km downstream (to 0.09 ng. L^{-1}). Uniform depth distributions of MeHg ($0.02 \pm 0.01 \text{ ng.L}^{-1}$) and conductivity ($9.8 \pm 1.3 \text{ }\mu\text{S.cm}^{-1}$) were only encountered in the reservoir during March 2012, when oxygen and temperature showed little variation with depth (subsurface-bottom waters: 7.4 - 2.5 mg. L^{-1} ; 29.1 - 28.2°C), indicating a poorly stratified water column. In this period, MeHg concentrations were uniformly low along the river downstream from the dam ($0.02 \pm 0.01 \text{ ng.L}^{-1}$), increasing only slightly between 200 km and 250 km downstream from the dam (0.05 ng. L^{-1}), where the floodplain of the Uatumã was inundated due to high-water conditions. During all sampling periods, oxygen levels increased in the first 35 km downstream from the dam (0.5 - 35 km : 4.9 ± 1.1 - $6.0 \pm 1.1 \text{ mg. L}^{-1}$).

Methylmercury levels in plankton

The methylmercury levels within each size-fraction of zooplankton from the Balbina reservoir were similar regardless of the sampling site or period (8 ± 3 and $12 \pm 4 \text{ }\mu\text{g.kg}^{-1} \text{ d.w.}$, respectively for 70 and $350 \text{ }\mu\text{m}$ fractions; Figure 3). Downstream from the dam, the levels in

March 2012 ($5\text{--}29 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w.) were, in general, lower than those in the other two sampling periods ($9\text{--}63 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w.). In March 2012, the zooplankton from the upstream site had MeHg levels ($8\pm 2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w.) similar to zooplankton in the first 35 km downstream from the dam ($9\pm 2 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w.), with an increase in levels in the flooded lower stretch of the Uatumã, reaching $26\pm 4 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w. at 250 km downstream. In the other two sampling periods (December 2011 and June 2012), zooplankton showed an increase in MeHg levels just below the dam. In December 2011, MeHg values were highest 35 km downstream ($34\pm 6 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w.), and then decreased along the lower Uatumã, which was in the dry phase of its flood cycle, reaching $11\pm 3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w. at 250 km downstream, similar to upstream values ($13\pm 3 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w.). In June 2012, MeHg levels increased along the Uatumã river reaching $63\pm 1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ d.w., the highest values observed, at 250 km downstream which was in peak flood stage (Figure 3).

Total mercury levels in piscivorous fish

The average total mercury levels in fish muscle in the reservoir, 5 km and 180 km downstream from the dam were 383 ± 143 , 663 ± 147 , and $733\pm 354 \mu\text{g.kg}^{-1}$ wet weight, respectively. Weight and standard length of fish were positively correlated (Pearson's test: UP: $r^2=0.95$, $p<0.0001$; DOWN₅: $r^2=0.89$, $p<0.0001$; DOWN₁₈₀: $r^2=0.92$, $p<0.0001$); therefore, in the following results and discussion fish size refers to standard length, rather than weight. Mercury levels in fish varied significantly between sites, with standard length, and with the interaction between these factors (ANCOVA: interaction: $F=7.311$, $p=0.008$; length: $F=5.762$, $p=0.018$; site: $F=21.562$, $p<0.0001$; Figure 4a). In order to better compare differences between sampling sites, we narrowed the standard length of fish considered to 24–31 cm which resulted in a slight reduction in sample size (UP: $n=31$; DOWN₅: $n=9$; DOWN₁₈₀: $n=13$). In general, the fish captured UP were smaller than DOWN (Figure 4a), with 24 cm being the smallest fish captured DOWN, and 31 cm the biggest captured UP. The selected fish had no statistical difference in standard length between sites (ANOVA: $F=2.272$, $p=0.114$) and those from upstream showed lower Hg levels than those from 5 and 180 km downstream (ANOVA: $F=24.741$, $p<0.0001$; Figure 4b).

Considering all specimens analyzed, 24, 86 and 97% of them at UP, DOWN₅ and DOWN₁₈₀ sites, respectively, exceeded the maximum recommended limit for human consumption ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ wet weight) established by the World Health Organization.²⁸

Discussion

The MeHg levels in Balbina reservoir and in the first 35 km downstream from the dam were strongly influenced by variations in thermal stratification of the reservoir among the different sampling campaigns. During the dry season sampling campaigns, the high MeHg concentrations in water exported from the hypolimnion of the reservoir to the river declined gradually until 200 km downstream from the dam. The higher methylmercury levels in plankton and fish downstream suggested that MeHg exported from the dam was accumulated by downstream biota. During the wet season sampling campaign, no evidence of vertical stratification was observed in the reservoir and, in general, the MeHg concentrations in the reservoir and in the river downstream were lowest. The seasonal inundation of alluvial wetlands and the larger discharge of tributaries may have contributed to the higher MeHg concentrations observed in the lower stretch of Uatumã during high-water sampling campaigns.

A hypolimnion with low oxygen levels and rich in MeHg was also observed in two other Amazon reservoirs, Samuel²³ and Petit-Saut,^{7,9} suggesting that methylation commonly occurs under these conditions.⁹ Samuel and Balbina are both of similar age and have no gold mining in their basins. Balbina has a 10-fold higher surface area than Samuel and longer hydraulic residence time, 14 compared to 3.5 months. These conditions could explain the higher MeHg levels in the hypolimnion of Balbina when compared with those from Samuel ($0.15 \pm 0.10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$).²³ Petit-Saut has a smaller surface area than Balbina, however, the former is deeper, younger (impounded in 1995), and develops a more anoxic hypolimnion with higher MeHg levels (reaches up to $1.1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$)⁷ than Balbina. At our sampling site in Balbina reservoir, MeHg levels varied with the degree of thermal stratification, with the lowest MeHg levels encountered during the wet season sampling campaign, when no evidence thermal stratification was observed. In the Petit-Saut and Elephant-Butte (USA) reservoirs, consistent changes in MeHg levels in water were also associated with stratification–destratification dynamics.^{4,7} Besides their influence on the reservoir per se, hypolimnetic processes thus

appear to have a strong affect on the biogeochemistry the river downstream, especially in the reach near the dam. We observed higher MeHg levels in river water and plankton just below the dam compared with those near the reservoir surface only in sampling campaigns where the reservoir was thermally stratified. At the Petit-Saut dam, mercury outputs from the reservoir were also 25% higher during the dry seasons than in the season when the water column was well mixed.⁷

The extent to which mercury levels remain high downstream from at dam may depend on the presence of large deep lakes that may trap MeHg-rich particles, as well as on the amount of dilution from tributaries below the reservoir.² Particle deposition is unlikely to have affected MeHg levels in the Uatumã river, especially in the first 35 km downstream, since this reach has no lakes or other lentic habitats and has frequent rapids and cascades that generate turbulence that maintains particles in suspension. Since there are some small streams flowing into this stretch, dilution may also have contributed to the observed decrease in the MeHg levels in river water. Discharge measured along 20 years (between 1977 and 1996) was, on average, $607 \pm 349 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ at 35 km downstream, a water load 9% greater than at 5 km downstream from the dam.²⁹ In contrast, the drop in MeHg levels in water observed over the same reach during the sampling campaigns of August 2011, December 2011 and June 2012 was much larger, 25, 42 and 23%, respectively. Therefore, we believe that other processes (besides the dilution) not evaluated in the present study, may have contributed to the observed decrease in MeHg levels. Demethylation, and the adsorption of MeHg on biofilms and on the geological substratum embanking the Uatumã may have all contributed to this decline. Moreover, during sampling campaigns when the reservoir was stratified, large particulates (flocks), presumably iron oxide precipitates, were regularly encountered, and the MeHg levels in these particulates decreased in the first 35 km below the dam (unpublished data) due apparently to an additional unidentified loss process.

Between 35 and 250 km downstream, dilution becomes more important due to the added discharge of larger tributaries, resulting in an average discharge of $2262 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ at 250 km downstream (unpublished data). Contrary to the trend expected by dilution, MeHg levels in water and plankton increased at 250 km in March and June 2012 (high-water period in this reach). During these two sampling campaigns, the lower reach of Uatumã river had lower oxygen and pH levels than those observed in August and December 2011 (low-water period). The higher discharge of tributaries in the lower reach in this period could have resulted in those limnological changes. Downstream from Petit-Saut reservoir, the inflow of tributaries resulted in the dilution of MeHg levels, but, also created favorable conditions for local

mercury methylation and, consequently downstream there are localized regions of dilution and production of MeHg.¹³ A similar effect could occur in the lower reach of the Uatumã river during the high-water season, with the enhancement of particulate mercury mobility and sulfate-reducing bacterial activity due to changes in limnological conditions. On the other hand, those limnological conditions could be a consequence of seasonal changes linked to the river flood pulse. During flooding, large inputs of allochthonous and autochthonous organic matter to alluvial wetlands result in anoxic and acidic conditions especially conducive to mercury methylation.³⁰ Assays of mercury methylation in the Tapajós river, identified the flooded forests and macrophyte mats, that are widely available during high-water season, as important compartments to the MeHg production.¹⁴ The flood pulse inundates 6300 km² of alluvial floodplain along the Uatumã river, mostly in the lower reaches during high-water season,³¹ and is a natural backwater effect linked to the flood dynamics of Amazon river main channel, occurring independently of the discharge pattern of Balbina dam. Regardless of whether the unique limnological conditions in the lower Uatumã are due to increased tributary inputs of the seasonal flood pulse, or a combination of both, they are both natural processes that could have contributed to a local increase in Hg methylation and concentrations in this region. Therefore, particularly during high-water sampling campaigns, in the lower stretch of Uatumã, local methylation probably had a greater influence on MeHg levels than export from the Balbina reservoir. In fact, during sampling campaigns at low-water season, MeHg levels declined at 250 km downstream. In summary, we conclude that MeHg dynamics in water and plankton of the Uatumã river near the dam is driven by the seasonal stratification of reservoir, while MeHg dynamics in the lower Uatumã is controlled by the seasonal flood pulse and/or tributary inputs. The suite of processes underlying these downstream changes is still unclear, and the scarcity of studies investigating biogeochemical processes over extended reaches below dams limits the discussion of more generalized patterns.

The plankton samples showed an increase in MeHg levels in the first 35 km downstream from the dam in the sampling campaigns in which the reservoir was stratified, evidencing that the MeHg exported by dam is taken up by plankton and, consequently, could be transferred to local biota. Methylmercury has high assimilation efficiency and low elimination rate by aquatic organisms.³² Zooplankton were estimated to take up 0.3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dry weight per km between 5 and 35 km downstream of the dam. The influence of this uptake on dissolved MeHg concentrations could not be determined, since zooplankton biomass was not estimated. However, the elevated rates of uptake indicated a high potential for MeHg transfer to higher trophic levels. An increase of about three times was also encountered in the

mercury levels of plankton just below Tucuruí, a permanently stratified reservoir in the eastern Amazon.³³ The lower levels of MeHg encountered in plankton just below the dam when the reservoir was unstratified in March 2012, indicated a strong link between stratification patterns, MeHg export and plankton contamination in this reach of the river. In contrast, the higher concentrations of MeHg encountered in plankton in the lower Uatumã during high-water samplings when compared with low-water samplings indicated the dominant influence of the season flood cycle on this pattern. The MeHg levels observed in zooplankton of Balbina reservoir are similar to those reported for zooplankton in four Brazilian reservoirs (Tucuruí, Santana, Vigário and Lajes reservoirs)²² and an artificial lake³⁴ in USA. However, they are lower than those encountered in other reservoirs located in Brazil²³, the USA,^{34,35} China³⁶ and Canada^{37,38} (up to 840 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dry weight). Some of these reservoirs with higher concentrations were contaminated by Hg from mining activities or are younger than Balbina. The levels of MeHg in the Uatumã river downstream from Balbina dam were similar or slightly lower than those encountered in the rivers downstream from Samuel²³ and Tucuruí²² dams, both Amazonian reservoirs. In the present study we did not evaluate the community structure and abundance in plankton samples and this may have biased our interpretation of their MeHg levels.

Higher mercury levels in fish immediately downstream from dams have also been reported for other Amazonian^{5,8,33} and temperate reservoirs.^{2,10} This pattern has been associated with the stratification of the reservoir-lake and downstream discharge of MeHg-rich hypolimnetic waters,⁵ or with differences in the feeding habits and trophic levels of fish above and below the dam.⁶ In the present study, we observed an increase of MeHg availability downstream from the dam due to hypolimnetic exportation, which apparently leads to a higher bioaccumulation of mercury by fish located immediately downstream. Since we studied piscivorous fish, differences in mercury levels in prey-species may have also contributed to this downstream trend. However, studies of the diet of *Cichla* spp. in Balbina reservoir^{39,40} and several Amazonian rivers including the Uatumã river⁴¹⁻⁴⁴ indicate that its feeding habits and trophic level are similar. Thus, we conclude that the higher Hg levels in fish from Uatumã river immediately downstream from Balbina reservoir are mainly due mercury export from the dam (“dam effect”). Studies in temperate reservoirs have revealed increases of mercury levels in fish caught from 275 to over 300 km downstream.^{10,2} We found that fish had similar mercury levels at 5 and 180 km downstream from Balbina dam. We suggest that, at DOWN₅, MeHg reaches fish mainly by hypolimnetic exportation through the dam; and at DOWN₁₈₀ by the combined influence of reservoir export and methylation in the

lower reach of the Uatumã. At the DOWN₁₈₀ site, fish may still be receiving mercury from the Balbina reservoir since MeHg concentrations in water and plankton decrease between 35 and 200 km downstream, the reservoir-derived MeHg can be still present at 180 km downstream. These fish may also be assimilating locally produced MeHg derived from tributaries inflows and/or natural wetlands. The variable mixture of MeHg from these sources (anthropogenic and natural) may have resulted in the high Hg levels encountered in fish from DOWN₁₈₀.

The genus *Cichla* is an important sport fish⁴⁵ and also an important protein source for populations living around the Balbina reservoir.²⁷ The consumption of *Cichla* ranges from one to seven times a week, with an average daily consumption per capita of 110 g for adults.²⁷ Considering this consumption and the mean of THg observed in fishes from Balbina reservoir, daily MeHg intake was estimated to range from 6-44 µg for inhabitants of reservoir. Most of the analyzed fish exceeded the mercury level recommended by World Health Organization for safe consumption,²⁸ especially those from downstream sites.

Mercury concentrations found in *Cichla* spp. in Balbina reservoir were of the same order of magnitude as those reported in earlier studies with this genus of fish from three Amazonian reservoirs (Samuel⁵, Balbina²⁷ and Tucuruí³³) and lower than those encountered in an Amazonian artificial lake impacted by gold-mining.⁴⁶ The Hg levels in fish from downstream sampling sites were of the same magnitude as those reported for *Cichla* spp. downstream from Tucuruí³³ and Samuel⁴⁷ dams. Considering all piscivores, the concentrations observed in *Cichla* from Balbina were similar to those reported piscivores in several tropical²², sub-tropical¹¹ and Canadian^{10,48,49} reservoirs but higher than those observed in the Brazilian reservoir of Lago Manso,¹² the Petit-Saut reservoir,⁵⁰ an artificial Amazonian lake⁴⁶ and some Canadian reservoirs,⁴⁹ that, in general, are younger than Balbina and/or have mercury contamination in their basin.

Studies of Hg dynamics should not be restricted to the areas immediately surrounding a reservoir. Basin-scale studies are needed to evaluate the combined effects of impoundment and natural processes, both above and below the dam, on mercury dynamics and human health risks.

Acknowledgments

The authors thank the financial support of CNPq, FAPPEAM and CAPES, and logistical support of INPA, Amazonas Energia, ICM-BIO/Rebio Uatumã and SEPROR. Thanks to

J.Rocha, A.Santos and B.Lima for assistance with fieldwork; C.Freitas, J.Zuanon, E.Ferreira and E.Dary for assistance with fish collection and identification; C.Horie and Idelfonso for precipitation data; and the staff of Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (UNIR) and Laboratório de Radioisótopos (UFRJ) for their help with mercury analyses.

Supporting Information Available

Precipitation at Balbina reservoir and water level of the Amazon river near the Uatumã's mouth are detailed. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

References

- (1) Paiva, M. P. Impacto das grandes represas sobre o meio ambiente. *Cienc. Cult.* **1983**, 35 (9), 1274-1282.
- (2) Schetagne, R.; Verdon, R. Post-impoundment evolution of fish mercury levels at the La Grande Complex, Québec, Canada (from 1978 to 1996). In *Mercury in the Biogeochemical Cycle*; Lucotte, M., Schetagne, R., Thérien, N., Langlois, C., Tremblay, A., Eds.; Springer: Berlin 1999; pp. 334.
- (3) Kemenes, A.; Forsberg, B. R.; Melack, J. M. Methane release below a tropical hydroelectric dam. *Geophys. Res. Lett.* **2007**, 34, GL 029479.
- (4) Canavan, C. M.; Caldwell, C. A.; Bloom, N. S. Discharge of methylmercury enriched hypolimnetic water from a stratified reservoir. *Sci. Total Environ.* **2000**, 260, 159-170.
- (5) Kasper, D.; Palermo, E. F. A.; Branco, C. W. C.; Malm, O. Evidence of elevated mercury levels in carnivorous and omnivorous fishes downstream from an Amazon reservoir. *Hydrobiologia.* **2012**, 694, 87-98.
- (6) Palermo, E. F. A.; Kasper, D. ; Reis, T. S.; Nogueira, S.; Branco, C. W. C.; Malm, O. Mercury level increase in fish tissues downstream the Tucuruí Reservoir, Brazil. *RMZ – Mater. Geoviron.* **2004**, 51, 1292-1294.
- (7) Muresan, B.; Cossa, D.; Richard, S.; Dominique, Y. Monomethylmercury sources in a tropical artificial reservoir. *Appl. Geochem.* **2008**, 23, 1101-1126.

- (8) Dominique, Y.; Maury-Brachet, R.; Muresan, B.; Vigouroux, R.; Richard, S.; Cossa, D.; Mariotti, A.; Boudou, A. Biofilm and mercury availability as key factors for mercury accumulation in fish (*Curimata cyprinoids*) from a disturbed Amazonian freshwater system. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, *26*, 45-52.
- (9) Coquery, M.; Cossa, D.; Peretyazhko, T.; Azemard, S.; Charlet, L. Methylmercury formation in the anoxic waters of the Petit-Saut reservoir (French Guiana) and its spreading in the adjacent Sinnamary River. *J. Phys. IV France.* **2003**, *107*, 327-331.
- (10) Anderson, M. R. Duration and extent of elevated mercury levels in downstream fish following reservoir creation. *River Syst.* **2011**, *19* (3), 167-176.
- (11) Li, S.; Zhou, L.; Wang, H.; Xiong, M.; Yang, Z.; Hu, J.; Liang, Y.; Chang, J. Short-term impact of reservoir impoundment on the patterns of mercury distribution in a subtropical aquatic ecosystem, Wujiang River, southwest China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 4396-4404.
- (12) Tuomola, L.; Niklasson, T.; Silva, E. C.; Hylander, L. D. Fish mercury development in relation to abiotic characteristics and carbon sources in a six-year-old, Brazilian reservoir. *Sci. Total Environ.* **2008**, *390*, 177-187.
- (13) Muresan, B.; Cossa, D.; Coquery, M.; Richard, S. Mercury sources and transformations in a man-perturbed tidal estuary: The Sinnamary Estuary, French Guiana. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2008**, *72*, 5416-5430.
- (14) Guimarães, J. R. D.; Roulet, M.; Lucotte, M.; Mergler, D. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. *Sci. Total Environ.* **2000**, *261*, 91-98.
- (15) Melack, J. M.; Wang, Y. Delineation of flooded area and flooded vegetation in Balbina reservoir (Amazonas, Brazil) with synthetic aperture radar. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **1998**, *26*, 2374-2377.
- (16) Figueiredo, M. D. M. A. M.; Laraque, A. *Balbina, 10 anos depois*; Hydrological and Geochemical Processes in Large Scale River Basins: Manaus, 1999.
- (17) *RADAM Brasil. Folha SA - 20 Manaus: Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra*; Levantamento de Recursos Naturais – 18; Ministério de Minas e Energia/ Departamento Nacional da Produção Mineral: Rio de Janeiro, RJ, 1978.
- (18) *EPA 1669: Method 1669, Sampling ambient water for trace metals at EPA water quality criteria levels*; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1996.

- (19) *EPA 1630: Method 1630, Methyl mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS*; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2001.
- (20) Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*; Ellis Horwood: Great Britain, 1994.
- (21) Creswell, J.; Engel, V.; Carter, A.; Davies, C. *2013 Brooks Rand Labs Interlaboratory Comparison Study for Total Mercury and Methylmercury (Intercomp 2013)*; Brooks Rand Labs: Seattle, 2013.
- (22) Palermo, E. F. A. Acúmulo e transporte de mercúrio em reservatórios tropicais. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2008.
- (23) Almeida, R. Estudo da origem, mobilização e organificação do mercúrio no reservatório da UHE de Samuel, RO. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2012.
- (24) Santos, R. N. Estratégias reprodutivas de peixes de um rio impactado por empreendimento hidrelétrico na Amazônia Central. Ph.D. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2012.
- (25) Horie, C. A. C. Biologia reprodutiva e estrutura da população do tucunaré *Cichla vazzoleri* (Perciformes: Cichlidae) no reservatório da hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2013.
- (26) Bastos, W. R.; Malm, O.; Pfeiffer, W. C.; Cleary, D. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. *Cienc. Cult.* **1998**, *50*, 255-260.
- (27) Kehrig, H. A.; Malm, O.; Akagi, H.; Guimarães, J. R. D.; Torres, J. P. M. Methylmercury in fish and hair samples from the Balbina reservoir, Brazilian Amazon. *Environ. Res.* **1998**, *77*, 84-90.
- (28) *FAO/WHO: Codex Alimentarius: Guideline Levels for Mercury in Fish (CAC/GL 7-1991)*; Commission (19th Session): Italy, 1991; www.fao.org/docrep/meeting/005/t0490e/t0490e00.htm.
- (29) *Agência Nacional de Águas Website*; <http://www.ana.gov.br>.
- (30) Roulet, M.; Lucotte, M.; Guimarães, J. R. D.; Rheault, I. Methylmercury in water, seston and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós river, Brazil. *Water Air Soil Pollut.* **2001**, *128*, 41-60.

- (31) Melack, J. M.; Hess, L. Remote sensing of the distribution and extent of wetlands in the Amazon basin. In *Amazon Floodplain Forests*; Junk, J. J., Piedade, M. T. F., Wittmann, F., Schongart, J., Parolin, P., Eds.; Springer: New York 2010; pp 60.
- (32) Fowler, S. W.; Heyraud, M.; La Rosa, J. Factors affecting methyl and inorganic mercury dynamics in mussels and shrimp. *Mar. Biol.* **1978**, *46*, 267-276.
- (33) Malm, O.; Palermo, E. F. A.; Santos, H. S. B.; Rebelo, M. F.; Kehrig, H. A.; Oliveira, R. B.; Meire, R. O.; Pinto, F. N.; Moreira, L. P. A.; Guimarães, J. R. D.; Torres, J. P. M.; Pfeiffer, W. C. Transport and cycling of mercury in Tucuruí reservoir, Amazon, Brazil: 20 years after fulfillment. *RMZ – Mater. Geoenviron.* **2004**, *51*, 1195-1198.
- (34) Kuwabara, J. S.; Topping, B. R.; Moon, G. E.; Husby, P.; Lincoff, A.; Carter, J. L.; Croteau, M. N. *Mercury accumulation by lower trophic-level organisms in lentic systems within the Guadalupe river watershed, California*; U.S. Geological Survey: California, 2005.
- (35) Stewart, A. R.; Saiki, M. K.; Kuwabara, J. S.; Alpers, C. N.; Marvin-DiPasquale, M.; Krabbenhoft, D. P. Influence of plankton mercury dynamics and trophic pathways on mercury concentrations of top predator fish of a mining-impacted reservoir. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2008**, *65*, 2351-2366.
- (36) Wang, Q.; Feng, X.; Yang, Y.; Yan, H. Spatial and temporal variations of total and methylmercury concentrations in plankton from a mercury-contaminated and eutrophic reservoir in Guizhou Province, China. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30* (12), 2739-2747.
- (37) Tremblay, A.; Lucotte, M.; Schetagne, R. Total mercury and methylmercury accumulation in zooplankton of hydroelectric reservoirs in northern Québec (Canada). *Sci. Total Environ.* **1998**, *213*, 307-315.
- (38) Plourde, Y.; Lucotte, M.; Pichet, P. Contribution of suspended particulate matter and zooplankton to MeHg contamination of the food chain in midnorthern Quebec (Canada) reservoirs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1997**, *54* (4), 821-831.
- (39) Cruz, S. V. Alimentação de species piscívoras do gênero *Cichla* spp., no Reservatório de Balbina Município de Presidente Figueiredo/AM. Relatório PIBIC, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 2012.
- (40) Oliveira Jr, A. B. Tácticas alimentares e reprodutivas do tucunaré-comum (*Cichla monoculus*, Agassiz, 1813) no reservatório da UHE de Balbina-AM. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 1998.
- (41) Rabelo, H.; Araújo-Lima, C. A. R. M. A dieta e o consumo diário de alimento de *Cichla monoculus* na Amazônia Central. *Acta Amaz.* **2002**, *32* (4), 707-724.

- (42) Novaes, J. L. C.; Caramaschi, E. P.; Winemiller, K. O. Feeding of *Cichla monoculus* Spix, 1829 (Teleostei: Cichlidae) during and after reservoir formation in the Tocantins River, Central Brazil. *Acta Limnol. Bras.* **2004**, *16* (1), 41-49.
- (43) Claro Jr, L. H. A influência da floresta alagada na estrutura trófica de comunidades de peixes em lagos de várzea da Amazônia Central. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2003.
- (44) Leite, R. G. Alimentação e hábitos alimentares dos peixes do rio Uatumã, na área de abrangência da usina hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 1987.
- (45) Santos, G. M.; Ferreira, E.; Zuanon, J. *Peixes Comerciais de Manaus*; Editora INPA: Manaus, AM, 2006.
- (46) Mol, J. H.; Ramlal, J. S.; Lietar, C.; Verloo, M. Mercury contamination in freshwater, estuarine, and marine fishes in relation to small-scale gold mining in Suriname, South America. *Environ. Res.* **2001**, *86*, 183-197.
- (47) Petrick, F. R. Bindung und akkumulation Von quecksilber in den vom goldabbau kontaminierten flubsedimenten des Rio Madeira, Rondônia, Brasilien. M.Sc. Dissertation, Ludwig Maximilians Universitat, Munich, Bavaria, 1993.
- (48) Brinkmann, L.; Rasmussen, J. B. High levels of mercury in biota of a new Prairie irrigation reservoir with a simplified food web in Southern Alberta, Canada. *Hydrobiologia.* **2010**, *641*, 11-21.
- (49) French, K. J.; Anderson, M. R.; Scruton, D. A.; Ledrew, L. J. Fish mercury levels in relation to characteristics of hydroelectric reservoirs in Newfoundland, Canada. *Biogeochemistry.* **1998**, *40* (2/3), 217-233.
- (50) Durrieu, G.; Maury-Brachet, R.; Boudou, A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *60*, 315-323.

Figures

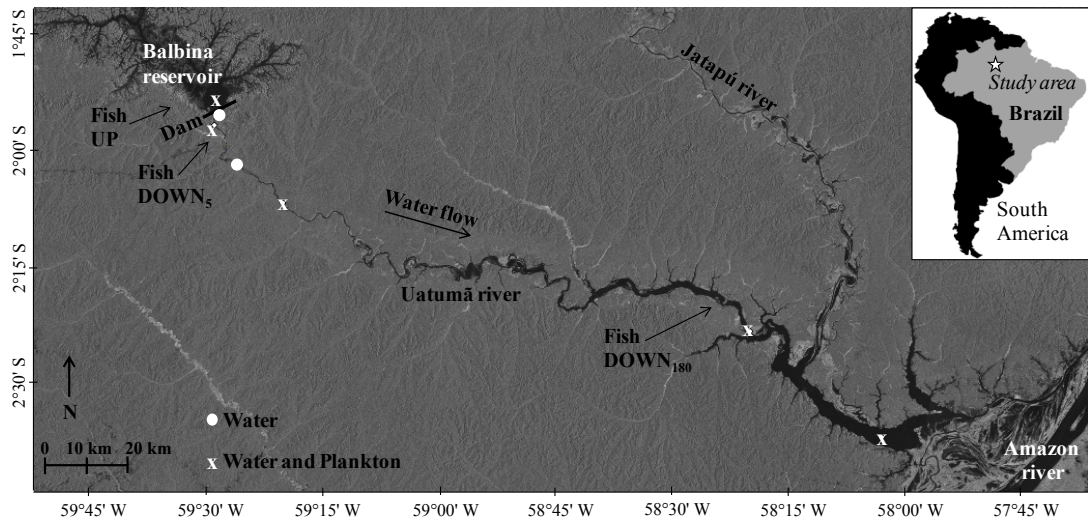


Figure 1. Sampling sites on Balbina reservoir and the Uatumã river, downstream from the dam. Background image is L band SAR acquired by the JERS-1 satellite in 1995 (Nasda/MITI). Fish UP, DOWN₅ and DOWN₁₈₀ correspond, respectively, to the sampling sites for fishes in the reservoir and in the Uatumã river, 5 and 180 km downstream from the dam.

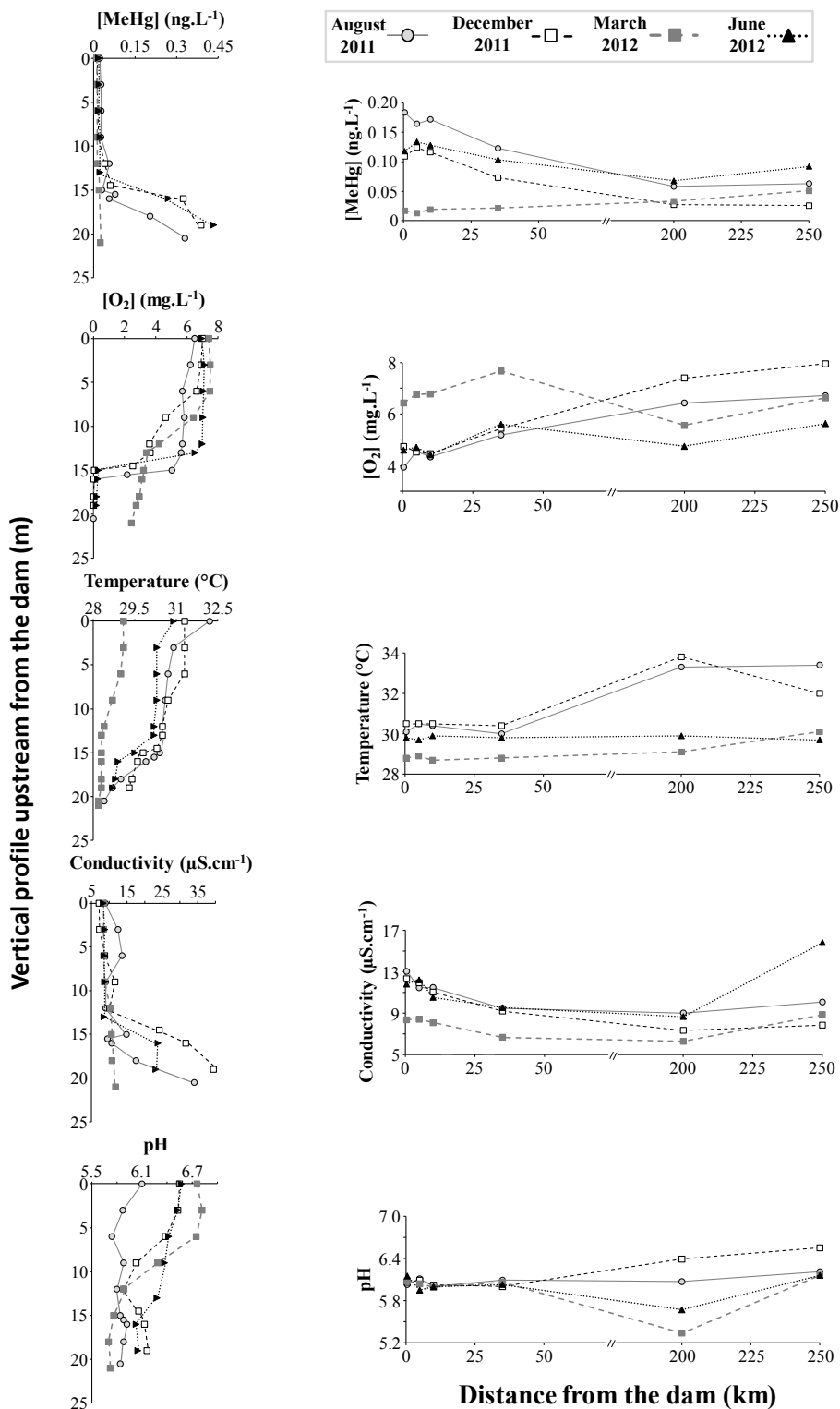


Figure 2. Seasonal variation in the vertical profiles of water quality parameters upstream from the Balbina dam (left), and in subsurface waters between 0.5 and 250 km downstream from the dam (right).

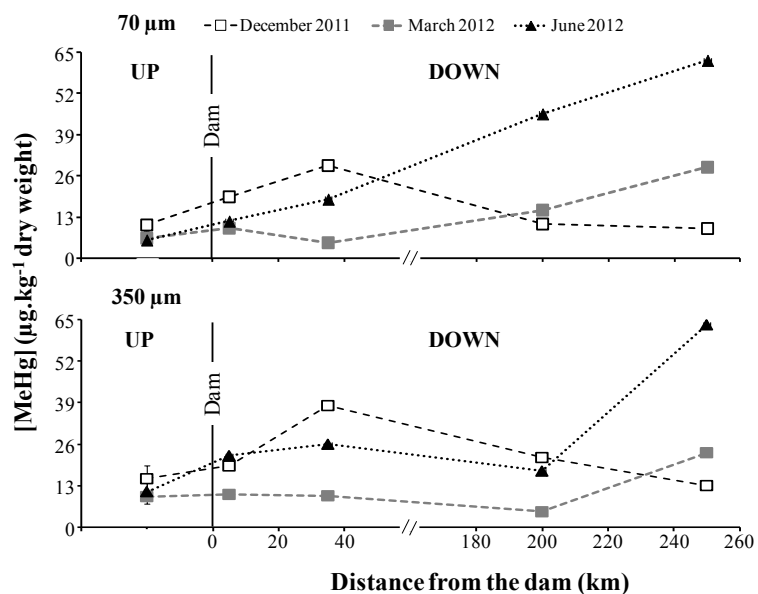


Figure 3. Seasonal and longitudinal variation in methylmercury levels in zooplankton collected with 70 and 350 µm mesh nets, and refined according to Palermo,²² upstream and downstream from Balbina dam. Upstream values means, and vertical bars, when bigger than the symbols, represent the standard deviation for triplicate samples.

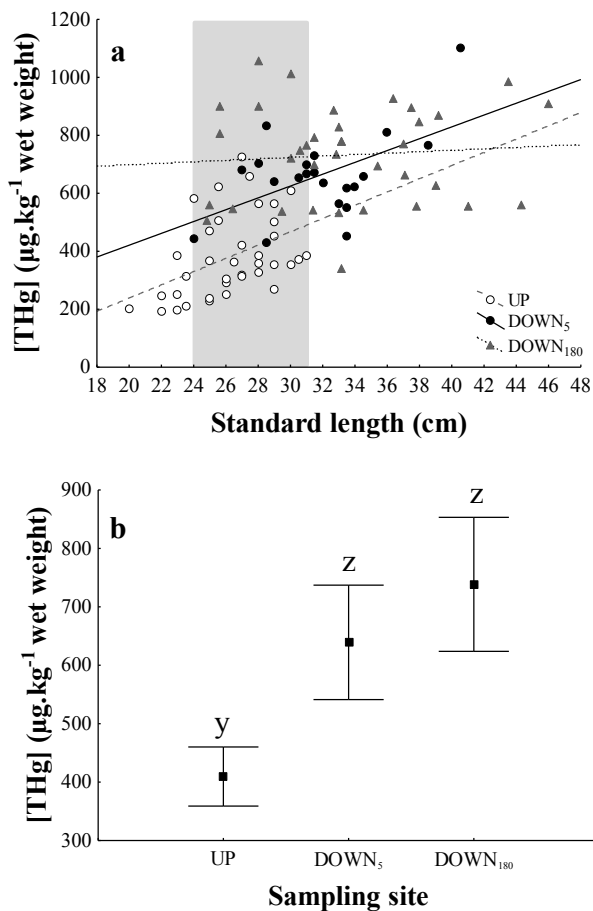


Figure 4. Total mercury levels in fish muscle (*Cichla* spp.) in relation to (a) fish standard length and (b) collection location. Locations include upstream from dam (UP) and 5 and 180 km downstream from Balbina dam (DOWN₅ and DOWN₁₈₀, respectively). Grey area represents selected fish based on its standard length (see text for details). These selected specimens are represented in (b), where black squares are the mean of THg levels, bars indicate 95% confidence intervals, and sampling sites that differ from each other at the significance level of 0.05 are presented with different letters (UP<DOWN₅=DOWN₁₈₀).

Supporting Information

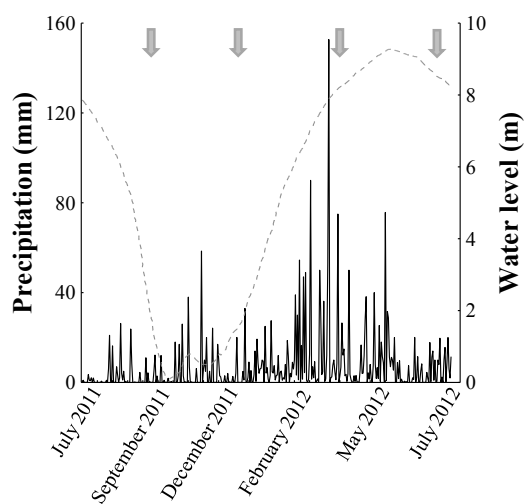


Figure S1. Precipitation at Balbina reservoir (black continuous line) and water level of the Amazon river near the Uatumã's mouth (grey dashed line) along the sampling year. Grey arrows indicate the sampling periods.

Capítulo 3

Kasper, D.; Forsberg, B.R.; Almeida, R.; Bastos, W.R. & Malm, O. 2014. Revisão dos métodos de coleta, pré-tratamento, preservação e armazenamento de amostras de água para análise de mercúrio. Manuscrito em preparação para *Química Nova*.

Revisão dos métodos de coleta, pré-tratamento, preservação e armazenamento de amostras de água para análise de mercúrio

Daniele Kasper^{1*}, Bruce R. Forsberg¹, Ronaldo de Almeida², Wanderley R. Bastos³, Olaf Malm⁴

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil

²Universidade Federal do Amazonas, Benjamin Constant, AM, Brazil

³Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

* Corresponding author: kasperdani@yahoo.com.br; Phone/Fax +55 92 3643 1904

INTRODUÇÃO

O ciclo do mercúrio (Hg) no ambiente é o resultado de processos físicos, químicos e biológicos extremamente complexos, muitos dos quais ainda não bem conhecidos, que envolvem volatilização, transporte, deposição, reações químicas e bioacumulação. Além de seu estado elementar, o mercúrio pode se ligar a diferentes ânions, formando compostos orgânicos ou inorgânicos que são designados espécies químicas (Azevedo 2003). Há uma série de processos naturais e antrópicos que influenciam na transformação entre as diferentes espécies de mercúrio e, conseqüentemente, influenciam no seu fluxo entre atmosfera, hidrosfera, biosfera e litosfera. Conhecer estas espécies, sua concentração nas diferentes matrizes ambientais e suas possíveis transformações químicas são os primeiros passos que possibilitam estudos ecológicos do ciclo do Hg em escala local ou global.

A avaliação da biota sempre foi alvo de pesquisas (*e.g.*, Kasper *et al.* 2007, Kehrig *et al.* 2013, Padovani *et al.* 1995) porque compreender a bioacumulação também significa avaliar a contaminação do homem. No entanto, para um melhor entendimento da contaminação da biota, é necessário avaliar o ciclo do elemento no meio ambiente. Cada espécie química apresenta concentrações diferentes nas matrizes ambientais e uma taxa de bioacumulação distinta. Portanto, outras matrizes ambientais também vêm sendo estudadas. Dentre as diversas matrizes abióticas avaliadas, a análise da água é um desafio para os pesquisadores porque suas concentrações são muito baixas, centenas a milhares de vezes menores do que na biota, tornando os protocolos de análise muito complexos.

Técnicas analíticas com limites de detecção muito baixos estão disponíveis atualmente, permitindo a análise de águas prístinas. A espectrofotometria de fluorescência atômica e a espectrofotometria de massa com plasma indutivamente acoplado são as técnicas mais comumente utilizadas para análise de água. No entanto, a primeira técnica tem maior sensibilidade e menores custos associados à instrumentação e manutenção, e por isso, é, em geral, preferida quando o único elemento de interesse é o Hg (Leopold *et al.* 2010). Associado ao desenvolvimento de técnicas analíticas houve necessidade de melhorar os protocolos que evitam a contaminação dessas amostras, pois em regra têm concentrações muito baixas e qualquer pequena contaminação pode deteriorar o resultado (Leopold *et al.* 2010). Muitos dos estudos históricos de elementos-traço em água, realizados antes do desenvolvimento de técnicas ultra-limpas, são erroneamente altos porque as concentrações refletem a contaminação da amostra ao invés das concentrações ambientais (Sañudo-Wilhelmy *et al.*

2004, Windom *et al.* 1991). Concomitantemente, houve o aprimoramento de metodologias de preservação das espécies químicas de Hg de interesse até o momento da análise. Algumas espécies de Hg são voláteis ou podem interagir com a superfície de frascos de coleta ou com outras moléculas presentes na amostra. A contaminação, perda e inter-conversão de espécies de Hg devem ser evitadas desde a coleta até o término da análise para que o resultado obtido seja confiável.

O objetivo deste trabalho é revisar as metodologias de coleta, pré-tratamento, preservação e armazenamento de amostras de água para a análise das espécies químicas de Hg mais comumente avaliadas. Estes métodos são discutidos avaliando a realidade dos laboratórios brasileiros, que buscam a validação de metodologias alternativas porque os protocolos muitas vezes sugerem materiais que não são vendidos ou são pouco disponíveis no Brasil, ou ainda, de custo tão elevado no país que limita ou inviabiliza as pesquisas com Hg em água.

FRASCOS DE COLETA

Qual tipo de garrafa utilizar?

A escolha correta do tipo de garrafa que será utilizada para a coleta e o armazenamento das amostras de água é fundamental. Vários tipos de materiais já foram testados como frascos de coleta (*e.g.*, PVC, polipropileno), e foi observado que muitos deles interagem com a amostra, alterando a concentração de algumas espécies mercuriais em horas ou dias (revisado por Yu e Yan, 2003). Por isso, o ideal é que o material da garrafa seja relativamente inerte para que não modifique a estabilidade das espécies mercuriais presentes. Em geral, materiais como o politetrafluoretileno (PTFE ou Teflon[®]) e vidro têm sido recomendados (EPA-1630 2001, EPA-1631 2002). O quartzo é um dos materiais que poderia ser empregado, no entanto, devido ao seu alto custo, sua utilização em análises laboratoriais rotineiras é impraticável (Yu e Yan 2003).

Apesar de serem ideais para a coleta de amostras de água, garrafas de PTFE não são amplamente encontradas no Brasil e muitas vezes apresentam alto custo, inviabilizando sua compra em grande quantidade (*e.g.*, para serem utilizadas em uma campanha amostral com muitos pontos de coleta). Garrafas de vidro são amplamente disponíveis a um baixo custo no

mercado brasileiro, ou podem ainda ser obtidas pela reutilização daquelas que armazenam ácidos como HCl, HNO₃ e H₂SO₄. Apesar do baixo custo, as garrafas de vidro são mais frágeis e pesadas do que as de PTFE, o que pode resultar, respectivamente, na perda de amostras e em altos custos de transporte.

A tampa da garrafa também deve ser de material inerte para evitar mudanças nas concentrações das espécies de mercúrio das amostras. As garrafas de PTFE em geral são vendidas com a tampa no mesmo material. As garrafas de vidro com tampa de vidro estão disponíveis no mercado, no entanto, elas não vedam bem e podem facilmente vazarem, causando perda ou contaminação da amostra. A disponibilidade de frascos de vidro com tampa ou batoque de PTFE é muito pequena no mercado brasileiro. Uma alternativa é utilizar garrafas de vidro com batoques feitos a partir de lâminas de PTFE que estão disponíveis no Brasil a um baixo custo. Para isso, basta cortar com tesoura de inox as lâminas no diâmetro da tampa da garrafa. Garrafas de vidro com batoques feitos a partir de lâminas de PTFE apresentaram branco de garrafa (de acordo com EPA-1630 2001, EPA-1631 2002) de $0,43 \pm 0,03 \text{ ng.L}^{-1}$ para o mercúrio total (D. Kasper dados não publicados) e de $0,01 \pm 0,01 \text{ ng.L}^{-1}$ para o metilmercúrio (Kasper *et al.* 2014).

Garrafas de polietileno não são adequadas para coleta e armazenamento de amostras de água para análise de mercúrio (EPA-1630 2001, EPA-1631 2002). As paredes internas das garrafas de polietileno têm sítios ativos que podem causar a rápida degradação do mercúrio orgânico (Stoeppler e Matthes 1978) e a interconversão entre espécies mercuriais (Bloom 2000). Além disso, elas possibilitam a perda de mercúrio por adsorção, redução (Heiden e Aikens 1979, Leermakers *et al.* 1990) e a difusão de Hg gasoso, especialmente o Hg⁰, devido à sua porosidade (Parker e Bloom 2005). O polietileno de baixa densidade permite maior difusão que o de alta densidade, mas ambos são inadequados para a coleta e armazenamento de amostras de água (Parker e Bloom 2005). O Hg⁰ pode migrar da ou para a amostra dependendo da concentração da amostra e do ar da sala onde a garrafa está guardada, assim a magnitude da difusão de Hg será proporcional à diferença de concentração entre o ambiente e a amostra (Parker e Bloom 2005). Apesar do polietileno não poder ser usado para estocar amostras de Hg, ele pode ser lavado em ácido quente e então ser usado para contato temporário com as amostras, como, por exemplo, em um funil de coleta de água de chuva (Parker e Bloom 2005).

Garrafas de politereftalato de etileno (PET) foram testadas para a coleta e o armazenamento de água e demonstraram resultados semelhantes às de vidro e PTFE para algumas espécies mercuriais (Copeland *et al.* 1996, Fadini e Jardim 2000). A PET é uma

alternativa para vários dos problemas supracitados, como fragilidade, peso no transporte, disponibilidade e preço no mercado brasileiro. Copeland *et al.* (1996) compararam o uso de garrafas de vidro e ptfé, validando a PET para a coleta e o armazenamento de amostras de água para análise de mercúrio total (HgT) com concentrações de 50-1500 ng.L⁻¹. Estas concentrações são altas comparadas àquelas normalmente observadas nos ambientes naturais (*e.g.*, Brigham *et al.* 2009, Fadini e Jardim 2001, Fu *et al.* 2013, Lechler *et al.* 2000, Montgomery *et al.* 1995). Posteriormente, Fadini e Jardim (2000) validaram o uso das garrafas PET para a coleta e o armazenamento de amostras de água naturais destinadas às análises de HgT e de Hg reativo com concentrações de 1-9 ng.L⁻¹, e de 0,3-2,0 ng.L⁻¹, respectivamente. Isso demonstrou a possibilidade de usar a PET para amostragem de águas naturais, com concentrações em ng.L⁻¹ (Fadini e Jardim 2000).

Garrafas de vidro, de PTFE e PET podem ser utilizadas para coleta e armazenamento de amostras de água destinadas à análise de HgT e Hg reativo. Para as demais espécies mercuriais, o vidro e o PTFE são os materiais validados até o momento (Tabela 1). É interessante utilizar garrafas de vidro na cor âmbar para auxiliar a proteger as amostras destinadas às análises de mercúrio dissolvido gasoso (MDG), Hg reativo e metilmercúrio (MeHg) já que estas espécies químicas podem ter suas concentrações modificadas pela ação da luz solar (Sellers *et al.* 1996, Silva *et al.* 2009). No entanto, o uso de garrafas transparentes ou translúcidas não inviabiliza a análise destas espécies químicas desde que a garrafa contendo a amostra esteja sempre protegida da luz, como por exemplo, dentro de caixas térmicas com tampa.

Detalhes de lavagem, preservação e tempo de estoque em cada tipo de garrafa serão discutidos nas seções posteriores.

Inserir Tabela 1.

Como lavar as garrafas antes da coleta?

As garrafas de vidro e de PTFE são normalmente reutilizadas inúmeras vezes para a coleta de água, e, para isso, devem passar por um rigoroso protocolo de limpeza. Já as garrafas do tipo PET em geral são descartadas após o uso devido ao seu baixo custo. Portanto, as etapas de limpeza da garrafa PET antes da utilização são muito mais simples.

Os protocolos EPA-1631 (2002) e EPA-1630 (2001) recomendam limpar as garrafas de vidro e de PTFE da seguinte maneira: preencher as garrafas com 4 N HCl (ou HNO₃ concentrado) e deixá-las em aquecimento (65-75 °C) por no mínimo 48 h dentro de uma capela com exaustão; esperar esfriar e enxaguar três vezes com água ultra-pura; preencher as garrafas com 1% HCl, tampar e deixar *overnight* em aquecimento (60-70 °C); esperar esfriar e enxaguar três vezes com água ultra-pura; preencher as garrafas com HCl 0,4% (v/v), tampar e deixá-las em um local limpo (*e.g.*, sala livre de mercúrio classe 100) até que as partes externas das garrafas estejam secas; verificar se as tampas estão bem vedadas e colocar cada garrafa em dois sacos tipo zip de polietileno limpos e novos. Antes da campanha para coleta, por segurança pode-se esvaziar o HCl 0,4% das garrafas e levá-las para a coleta com HCl 0,04% (v/v), com água ultra-pura ou vazias (EPA-1631 2002). Se a garrafa havia armazenado uma amostra com concentração menor que 100 ng.L⁻¹, todos os passos do protocolo de limpeza devem ser iguais, exceto o primeiro, em que a garrafa pode ficar em aquecimento somente por 6-12 h ao invés de 48 h (EPA-1630 2001, EPA-1631 2002).

Para evitar o acúmulo de mercúrio nas paredes das garrafas de vidro e de PTFE, recomenda-se uma pré-limpeza das mesmas com BrCl diluído (EPA-1630 2001, EPA-1631 2002). Para isso, as garrafas devem ser preenchidas com uma solução de 0,02 N BrCl *overnight*. Após este período, o BrCl deve ser neutralizado com a adição de 0,2 mL de uma solução NH₂OH 20% e as garrafas podem ser limpas de acordo com EPA-1630 (2001) e EPA-1631 (2002), como descrito acima, com exceção do primeiro passo, em que a garrafa pode ficar em aquecimento somente por 6-12 h ao invés de 48 h (EPA-1630 2001, EPA-1631 2002). Esta pré-limpeza com BrCl é especialmente útil nas garrafas de PTFE pois elas podem adsorver Hg⁰ nas paredes, que é difícil de remover somente com as etapas de HCl e aquecimento (Parker e Bloom 2005). Além disso, se a amostra que havia na garrafa não foi oxidada dentro da mesma, pode ocorrer a adsorção de Hg²⁺ nas paredes, o que as etapas de limpeza de HCl a quente nem sempre conseguem remover, contaminando a próxima amostra a ser guardada naquela garrafa (Parker e Bloom 2005). Portanto, também neste caso a pré-limpeza com BrCl seria muito importante (Parker e Bloom 2005). Outras maneiras de realizar uma pré-limpeza das garrafas é lavá-las com ácido nítrico concentrado a quente ou, no caso das garrafas de vidro, por incineração em mufla a 475 °C por várias horas (Parker e Bloom 2005), observando se o tipo de vidro resistirá a essa temperatura.

Para a limpeza das garrafas de vidro, Leopold *et al.* (2010) recomendam o seguinte protocolo: enxaguar três vezes com HCl 1% (v/v); preencher com BrCl 10% (v/v) e deixar por 24 h; enxaguar três vezes com água ultra-pura; repetir as duas últimas etapas (BrCl e enxague

com água ultra-pura) em uma sala limpa como por exemplo classe 100; aquecer a garrafa a 250 °C por no mínimo 12 h; depois de esfriar, tampar, embalar em sacos plásticos e guardar em local limpo até o uso. Para a limpeza das garrafas de PTFE, Leopold *et al.* (2010) recomendam seguir os mesmos passos de limpeza das garrafas de vidro descritos acima com exceção da etapa final de aquecimento da garrafa a 250 °C. Em substituição a esta etapa, deve-se preencher a garrafa com água ultra-pura e assim tampar, embalar em dois sacos plásticos tipo zip e guardar até o uso (Leopold *et al.* 2010).

Às vezes a limpeza das tampas e batoques não é eficiente porque a solução de limpeza (*e.g.*, HCl, BrCl) que preenche a garrafa não está encostando em toda a tampa ou batoque. Para evitar isso, Parker e Bloom (2005) recomendam que durante a pré-limpeza com BrCl diluído, as garrafas sejam invertidas para permitir o contato da solução com a tampa ou batoque por *overnight*. Já Leopold *et al.* (2010) recomendam um protocolo específico de limpeza para as tampas que consiste em: enxaguar três vezes com HCl 1% (v/v); mergulhar em BrCl 10% (v/v) por 24 h; enxaguar três vezes com água ultra-pura; repetir as duas últimas etapas (BrCl e enxague com água ultra-pura) em uma sala limpa como por exemplo classe 100; deixar secar em uma sala limpa e então usar as tampas para fechar as garrafas já descontaminadas.

Alternativamente, garrafas certificadas podem ser compradas, no entanto, ainda assim brancos de garrafa de cada lote devem ser avaliados de acordo com a metodologia descrita abaixo (EPA-1631 2002). As garrafas certificadas têm um custo maior do que as garrafas de vidro e PTFE comuns justamente por serem limpas. Como vantagens, usando este tipo de garrafa o laboratório gastará menos com reagentes, espaço laboratorial e pessoal porque não haverá necessidade de fazer a limpeza da mesma. Estas garrafas podem ser muito úteis para aqueles laboratórios que estão iniciando trabalhos de determinação de Hg em água, e que ainda estão treinando pessoal e estabelecendo os melhores protocolos de limpeza das garrafas. Ou ainda para aqueles laboratórios que eventualmente fazem coletas de água para análise de Hg, e que, portanto, não têm os protocolos de descontaminação das garrafas como rotina.

A preparação das garrafas PET para a coleta é muito mais simples que as de PTFE e vidro. A PET pode ser adquirida direto da fábrica e/ou com água mineral e descartada como plástico reciclável após o uso, evitando o tempo e os reagentes demandados devido aos exaustivos protocolos de lavagem das garrafas de vidro e PTFE. Como não são reutilizadas, as garrafas PET evitam ainda os problemas de contaminação cruzada pelo armazenamento anterior de amostras muito contaminadas. A preparação da garrafa PET para coleta consiste em: descarregar a água mineral original (quando for comprada com água); lavar várias vezes

com água ultra-pura; secar em uma capela classe 100; encher com 100 mL de 0,1 mol.L⁻¹ de HCl de alta pureza; embalar em 3 sacos plásticos tipo zip e guardar em local limpo até o uso (Fadini e Jardim 2000). Assim, uma das vantagens da utilização das garrafas PET para coleta de água é economia do tempo do pessoal de laboratório, reagentes e espaço laboratorial que são consumidos durante a lavagem das garrafas de vidro e PTFE.

Antes de ir para a campanha amostral, ao menos 5% das garrafas de cada lote limpo ou comprado (no caso de garrafas certificadas) deve ser testado para verificar se a limpeza foi eficiente e as garrafas estão então com um nível de contaminação por Hg aceitável e, portanto, prontas para o uso (EPA-1630 2001, EPA-1631 2002). Para analisar estes brancos de garrafa, as mesmas devem ser preenchidas com água ultra-pura acidificada a pH < 2, fechadas e guardadas por no mínimo 24 h (EPA-1631 2002). Para garrafas que serão testadas para contaminação por MeHg, a solução deve ser HCl 0,4% (EPA-1630 2001). Se a concentração observada na solução ácida for maior que a concentração mínima de quantificação do método, o problema de contaminação deve ser identificado, os procedimentos de limpeza corrigidos, e todo o lote de garrafas deve ser rejeitado ou limpo antes do uso (EPA-1630 2001, EPA-1631 2002). Parker e Bloom (2005) recomendam que todas as garrafas que armazenaram amostras de água com concentração de HgT > 50 ng.L⁻¹ devem ser testadas depois da limpeza. Este teste pode ser feito enchendo a garrafa com uma solução de BrCl 0,5% em água ultra-pura (v/v) e deixando por *overnight*. No dia seguinte deve-se quantificar o HgT desta solução para verificar se o processo de limpeza da garrafa foi eficiente, evitando a contaminação cruzada (Parker e Bloom 2005).

Independentemente de qual protocolo de limpeza será seguido, é essencial que as garrafas sejam testadas quanto a possível contaminação ou ineficiência de limpeza. Mesmo os laboratórios com muita experiência neste tipo de análise devem testar cada lote de garrafas porque eventualmente alguma contaminação ou falha no processo podem ocorrer fazendo com que as garrafas fiquem inadequadas ao uso.

PROEDIMENTOS DE COLETA

Durante os procedimentos de coleta, é essencial que a amostra de água não seja contaminada e nem perdida. O ambiente de coleta não é um ambiente que possa ser controlado pelo analista como uma sala de um laboratório, onde muitas das condições podem

ser ajustadas. Assim, entender os possíveis meios de contaminação e alteração da amostra pelo ambiente natural e pelos aparatos de coleta é o primeiro passo para que o coletor possa agir de maneira correta, prevenindo a contaminação da amostra e a inter-conversão entre as diferentes espécies mercuriais.

As amostras de água podem ser coletadas manualmente pela submersão direta da garrafa na água. É interessante amostrar alguns centímetros abaixo da superfície (sub-superfície) para evitar a coleta da camada superficial que tem características diferentes do restante da coluna d'água (Chester 1990), a não ser que este seja justamente o objetivo da coleta. Para evitar a contaminação atmosférica, a garrafa pode ser aberta e fechada somente quando já estiver mergulhada na água, ou pode ser imersa rapidamente após abrir a tampa (EPA-1669 1996). Esse procedimento será essencial em regiões onde a contaminação pelo ar é importante; onde há relevante quantidade de partículas em suspensão no ar, em regiões com solo exposto/nu e sujeito à erosão pelo vento, perto de cidades, tráfego de veículos, indústrias e queimadas, pois estas podem ser importantes fontes de contaminação por mercúrio.

A água também pode ser coletada com o auxílio de um aparato de coleta (*e.g.*, uma garrafa de van dorn para amostragens do hipolímnio de um lago). Se o objetivo é quantificar o mercúrio gasoso dissolvido na água, uma garrafa de coleta do tipo fluxo contínuo pode ser adequada porque não provoca o borbulhamento da amostra durante o processo de coleta, evitando perdas da fase gasosa (Marins *et al.* 2002). Todos os aparatos de coleta devem ser lavados com ácido diluído e água ultra-pura e levados para o campo embalados em sacos plásticos limpos, protegidos de possíveis fontes de contaminação. Se o coletor sabe *a priori* que uma amostra terá maior concentração de mercúrio que outra, deve coletar primeiro a amostra menos contaminada (EPA-1669 1996). Se isso não é possível pela logística de campo, ou se não há conhecimento do corpo d'água, o aparato de coleta deve ser lavado entre uma amostragem e outra com ácido diluído e água ultra-pura (EPA-1669 1996). Amostras muito contaminadas não devem ser processadas concomitantemente com amostras pouco contaminadas (EPA-1669 1996).

As amostras devem ser coletadas à montante do movimento do barco, direcionando o frasco de modo que a boca fique em sentido contrário à corrente (EPA-1669 1996). Se o sistema aquático for praticamente estático, o coletor deve movimentar o frasco lentamente no sentido do barco para frente, para criar uma corrente artificial. Motores a gasolina ou diesel devem ser evitados sempre que possível para evitar a contaminação da amostra pelo ar. No entanto, se a coleta ocorrer em ambiente que exija um barco com motor, ele deve ser desligado longe o suficiente do ponto de coleta para evitar a contaminação, e o deslocamento

até o local de coleta deve ocorrer manualmente (*e.g.*, remando) com o motor desligado (EPA-1669 1996). Os aparatos que entram em contato com a amostra não devem ficar no chão do barco, pois pode haver resquícios de óleo e gasolina que podem contaminar a amostra. Para evitar isto, todos os materiais podem ser carregados dentro de caixas plásticas de paredes grossas com tampa. As garrafas contendo amostras de água podem ser transportadas em caixas térmicas, o que auxilia a protegê-las do calor e da luz solar. Isso é especialmente importante para as amostras destinadas às análises de MDG, mercúrio reativo e MeHg, pois a concentração destas espécies químicas na água pode ser alterada devido à ação da luz solar (Sellers *et al.* 1996; Silva *et al.* 2009).

Seja pela imersão da garrafa diretamente na água, ou utilizando algum aparato de coleta, a amostragem deve seguir o protocolo do mão suja/mão limpa (EPA-1669 1996). Um membro da equipe é designado como o mão suja, enquanto outro é o mão limpa. Todas as atividades que envolvam o contato com a garrafa e a transferência da amostra para a garrafa são realizadas pelo mão limpa. Todas as outras atividades, que não envolvam contato direto com a amostra ou a garrafa de coleta, são realizadas pelo mão suja. Apesar desta separação de atividades parecer lógica, sua realização em campo vai requerer coordenação e prática dos dois coletores, e realizar uma espécie de ensaio antes da coleta pode ser muito útil.

No momento da coleta, o mão suja abre o saco plástico externo que guarda a garrafa. O mão limpa deve abrir o saco plástico interno e pegar a garrafa; retirar a solução ácida (ou a água ultra-pura) que está dentro da garrafa; encher parcialmente com água do local; tampar e agitar para que a água do local enxague bem as paredes internas da garrafa e despejar a água. O mão limpa deve repetir este enxague com água do local três vezes, e somente depois preencher com água local que será guardada como amostra. Ao final, verificar se a garrafa está bem vedada para evitar vazamentos e trocas de Hg gasoso entre a atmosfera e a amostra (EPA-1630 2001). O mão limpa então coloca a garrafa com a amostra no saco interno e insere este no saco externo. O mão suja fecha o saco externo e coloca a garrafa na caixa térmica para o transporte (EPA-1669 1996). As garrafas contendo as amostras devem ser mantidas ao abrigo do Sol. Se possível, não tocar na parte interna dos frascos de coleta (como tampas, batoques, parede interna da garrafa), mesmo o coletor mão limpa, para evitar a transferência de possíveis contaminações da luva para a amostra. Não fumar (a fumaça do cigarro pode contaminar fortemente as amostras), falar ou comer durante o procedimento da coleta de amostras (EPA-1669 1996).

Os coletores devem utilizar luvas limpas e livres de pó durante o procedimento de coleta (EPA-1669 1996). Estas só devem ser colocadas no momento da amostragem para

evitar que sujem. As luvas estão tão limpas quanto o último objeto tocado, e ao vesti-las, as mãos nuas não devem tocar no exterior das mesmas (Campos *et al.* 2002). Vestir uma sequência de luvas (uma em cima da outra) pode facilitar a troca da luva durante os procedimentos de coleta, assim, caso seja necessário trocar a luva, pode-se retirar aquela que está suja (mais externa), e uma limpa já estará vestida na mão. Isso evita parar o procedimento de coleta. O mão limpa deve vestir luvas longas para poder imergir o braço na água durante a coleta. Na falta de luvas longas, pode-se usar um saco plástico grande limpo que cubra desde a mão até o antebraço, prendendo o mesmo com um elástico (Campos *et al.* 2002). Para cada amostra deve-se utilizar um par de luvas limpo.

Utilizar equipamentos de proteção individual para proteger a amostra, e também para proteger o coletor de águas contaminadas por patógenos ou substâncias químicas e da solução ácida que está dentro das garrafas e que é descartada durante o procedimento de coleta. A identificação das amostras deve ser feita pelo lado externo do saco plástico zip externo para evitar contaminação da garrafa com as tintas de canetas. Convém levar garrafas adicionais, pois as mesmas podem quebrar, ser contaminadas ou vazar, obrigando o coletor a substituir a garrafa. No caso da coleta de água de chuva, as garrafas podem ser simplesmente esvaziadas antes de colocadas no coletor, visto que tanto a possibilidade de contaminação com os resíduos, como a possibilidade de diluição da amostra são muito pouco prováveis (Campos *et al.* 2002).

PROCESSAMENTO DA AMOSTRA APÓS A COLETA E SUA PRESERVAÇÃO

O processamento da amostra após a coleta pode ocorrer ainda em campo ou no laboratório. O envio da amostra para o laboratório ajuda a minimizar o potencial de contaminação da amostra tendo em vista que, em geral, os possíveis meios de contaminação da amostra em laboratório são menores que em campo. No entanto, esta decisão de processar ou não a amostra em campo depende do tipo de campanha amostral realizada. Por exemplo, em campanhas amostrais de dias a semanas (*e.g.*, campanhas oceânicas ou em muitas regiões isoladas da Amazônia), as amostras devem ser pré-processadas, preservadas e muitas vezes analisadas ainda em campo, pois não há tempo hábil de envio da amostra para o laboratório.

O pré-processamento e a preservação da amostra são dependentes da espécie mercurial alvo e do tempo que o coletor pretende deixar a amostra armazenada até o momento da análise. As espécies mercuriais mais comumente analisadas em águas naturais são: Hg dissolvido gasoso, Hg reativo, MeHg e HgT. As duas últimas podem ainda ser analisadas em sua forma total na água ou como uma razão dissolvido/associado ao material particulado (Figura 1). Detalhes do pré-processamento, preservação e armazenamento de cada uma destas espécies são discutidos a seguir.

Inserir Figura 1.

MDG

O MDG compreende as espécies voláteis de mercúrio, que são em sua maioria Hg⁰, e uma pequena fração de outras espécies como o Dimetil-Hg e o HgCl₂ (Mason e Fitzgerald 1990, Vandal *et al.* 1991). Durante a coleta das amostras destinadas às análises de MDG, deve-se evitar o borbulhamento da água. As amostras devem ser mantidas refrigeradas, no escuro e sem *headspace*. A preservação é difícil porque esta espécie é muito instável; portanto, para evitar perdas, o MDG deve ser separado das amostras dentro de algumas horas após a coleta pela aeração da água com argônio ou nitrogênio (99,999%) isentos de mercúrio (Fitzgerald 1986, Mason e Fitzgerald 1991). A aeração ocorre em um frasco extrator, que pode ser feito com vidrarias do laboratório ou com uma garrafa PET adaptada para este fim (Bisinoti 2005). Após borbulhar a amostra, o ar passa por uma coluna contendo cal sodada para absorver a umidade (Magarelli 2006), e depois é direcionado para o equipamento de análise para a quantificação do Hg gasoso total (O'Driscoll *et al.* 2003) ou do Dimetil-Hg (EPA-1630 2001). Se no momento do borbulhamento da amostra o equipamento de análise não estiver disponível, o ar deve passar (após a coluna com cal sodada) por um trap contendo areia coberta de ouro ou um trap Tenax[®]/Carbotrap[®] para a captura do Hg gasoso total ou do Dimetil-Hg, respectivamente (Coquery *et al.* 1997, Tseng *et al.* 2003), que depois serão analisados no equipamento analítico.

Hg reativo

O Hg reativo é definido como todo o Hg presente na forma oxidada que pode facilmente ser reduzido a Hg^0 pela adição de um redutor (Leopold *et al.* 2010, Marins *et al.* 2002). Inclui principalmente o Hg^{2+} dissolvido e o Hg fracamente associado a orgânicos (Gill e Fitzgerald 1987). Para separá-lo da água, a amostra já purgada para a retirada de MDG deve ser incrementada com um redutor, como por exemplo SnCl_2 em meio ácido (Bloom 1994, Marins *et al.* 2002), SnII ou ácido fórmico (Leopold *et al.* 2010), e borbulhada da mesma maneira que foi realizado para o Hg gasoso total porque o Hg reativo será transformado em Hg^0 devido à presença do redutor. As amostras de Hg reativo devem ser purgadas dentro de algumas horas após a coleta.

Para evitar a contaminação da amostra, a solução redutora pode ser previamente purgada com argônio ou nitrogênio isento de Hg (Marins *et al.* 2002, Bisinoti 2005) durante 30-45 minutos (Fadini e Jardim 2000, Bisinoti 2005) a 3 horas (Marins *et al.* 2002). O tempo de purga deve ser ajustado de acordo com a concentração de Hg do redutor e com o fluxo de ar utilizado para borbulhar. Testes de branco de reagentes auxiliarão neste ajuste do tempo necessário. O mesmo procedimento pode ser realizado com os demais redutores utilizados nas análises de Hg (*e.g.*, cloridrato de hidroxilamina), auxiliando a diminuir o branco de reagentes e a contaminação das amostras.

MeHg

O MeHg pode ser fotodegradado (Sellers *et al.* 1996), sendo a luz solar mais eficiente na degradação do que a fluorescente (Parker e Bloom 2005). É importante evitar a exposição das amostras à luz solar, mas durante a rotina de análises no laboratório, não é necessário protegê-las da luz fluorescente (Parker e Bloom 2005). O uso de garrafas de vidro âmbar e de caixas não transparentes para transportar as amostras pode auxiliar a proteger as águas da fotodegradação.

Em amostras de água filtrada, o MeHg permanece estável por até uma semana na amostra preservada refrigerada (1-4 °C) no escuro (Parker e Bloom 2005). Para a amostra não-filtrada, este tempo pode ser menor, de dias, devido à demetilação biológica (Parker e Bloom 2005). Para preservar por mais tempo, as amostras devem ser estocadas refrigeradas

(0-4 °C) no escuro, e, dentro de 48 h após a coleta, as águas continentais com baixa concentração de Cl⁻ devem ser acidificadas com HCl 0,3-0,5% (v/v) e as águas salobra e salgada ([Cl⁻] > 500 ppm) com H₂SO₄ 0,1-0,2% (v/v) (EPA-1630 2001). Amostras preservadas com HNO₃ não podem ser analisadas para MeHg pois ele é parcialmente decomposto pelo ácido nítrico durante a etapa da destilação (EPA-1630 2001) e do armazenamento, com cerca de 30% de perda em um mês (Parker e Bloom 2005). Se adequadamente preservadas (acidificadas, resfriadas e no escuro), o protocolo EPA-1630 (2001) estabelece que as amostras possam ser armazenadas por até seis meses. No entanto, Parker e Bloom (2005) observaram que após 250 dias (> 8 meses), não houve perdas significativas de MeHg e as amostras continuaram adequadas às análises. É possível que a água possa ser armazenada por um período ainda mais longo, entretanto, testes devem ser realizados para verificar o período máximo de estocagem, pois até o momento, o maior tempo avaliado foi de 250 dias.

O MeHg não é estável em ácido concentrado, portanto o HCl ou H₂SO₄ utilizados geralmente não resultam em contaminação das amostras. Ainda assim, o método EPA-1630 (2001) recomenda utilizar ácido com concentração de Hg < 5 pg.mL⁻¹. A acidificação da água, mesmo em amostras de água filtrada, pode causar a coagulação de carbono orgânico dissolvido formando flocos que podem adsorver Hg e se depositar no fundo da garrafa (Bloom 1994). Assim, as amostras devem ser homogeneizadas antes de se remover uma sub-amostra para análise. Em geral, agitar bem a garrafa antes de retirar uma alíquota é suficiente.

Garrafas de PTFE e de vidro com tampa ou batoque de PTFE são aceitáveis para a coleta e o armazenamento de amostras de água para análise de MeHg (EPA-1630 2001). O enxague das garrafas com água ultra-pura durante a lavagem e com a água do local durante a coleta deve ser feito com muita atenção para que se remova todo resíduo de oxidantes utilizados na limpeza destes frascos, prevenindo a decomposição do MeHg (Leopold *et al.* 2010).

HgT

A água destinada à análise de HgT deve ser manuseada cuidadosamente para evitar a contaminação da amostra. Ao contrário do MeHg, a contaminação da amostra por HgT é mais difícil de ser controlada, o que exige muito investimento de tempo para o treinamento de

pessoal e ajuste de protocolos. A utilização de aparatos adequados (como salas classe 100 e capelas de fluxo laminar) auxilia no controle da contaminação. Entretanto, nem sempre os laboratórios dispõem destes materiais, e, muito menos, os laboratórios de campo, onde muitas vezes as amostras devem ser manipuladas. Além de todas as recomendações já citadas nas seções anteriores, algumas atitudes podem auxiliar no controle da contaminação: utilizar luvas e roupas limpas e livres de pó durante o manuseio das amostras; revestir as bancadas com plásticos limpos; armazenar todo material necessário à coleta em dois sacos plásticos limpos (desde pipetas até equipamentos); utilizar somente vidraria cuidadosamente lavada e exclusiva para as amostras de água, separada do restante de vidraria do laboratório.

Quando a amostra é utilizada para quantificar outras espécies mercuriais além do HgT, deve ser preservada, em um primeiro momento, de acordo com os protocolos dessas espécies a serem avaliadas porque para a quantificação do HgT toda a informação da especiação é perdida. Uma vez que as outras espécies tenham sido determinadas, uma das formas de preservar a água para a análise de HgT é adicionar 5 mL.L⁻¹ de BrCl à garrafa para ter certeza de que qualquer Hg aderido às paredes da garrafa seja resolubilizado antes da análise. O BrCl destrói toda informação de especiação, pois promove a conversão de todo o Hg presente na amostra a Hg²⁺, inclusive destruindo os complexos orgânicos (EPA-1631 2002, Parker e Bloom 2005). Se a adição do BrCl à garrafa não for possível, as sub-amostras de água utilizadas na análise de HgT devem ser retiradas somente após forte agitação da garrafa, para remover qualquer Hg aderido às paredes (EPA-1631 2002). No entanto, a adição do oxidante à garrafa é preferível porque assim a remoção do Hg aderido às paredes da garrafa é mais eficiente.

Após aproximadamente 12 h da adição do BrCl, a cor amarelada do reagente na amostra deve se manter. Caso contrário, mais BrCl deve ser adicionado à amostra até que ela tenha uma cor amarelada permanente. O desaparecimento da cor amarela significa que houve consumo de todo o oxidante pela matéria orgânica ou sulfetos presentes na amostra. Frascos de coleta transparentes facilitam esta inspeção visual do excesso de BrCl. Uma vez que a amostra esteja preservada com BrCl, a temperatura de estoque da garrafa não é crítica, ela pode ser guardada em temperatura ambiente. Utilizando garrafas de vidro ou de PTFE e a preservação com BrCl, o método EPA-1631 (2002) estabelece que a amostra permanece adequada por até 90 dias a partir da data de coleta. No entanto, Parker e Bloom (2005) verificaram que, preservando desta maneira, o HgT foi completamente recuperado após 300 dias de armazenamento. Utilizando garrafas do tipo PET para a coleta e o armazenamento da

água, as amostras podem ser preservadas com a adição de 1 mL.L⁻¹ de BrCl e devem ser analisadas em até 14 dias (Fadini e Jardim 2000).

A utilização de uma única garrafa contendo amostra de água para análise de diferentes espécies mercuriais pode ocasionar dois problemas, contaminação da amostra e super-estimativa de sua concentração. Ao abrir e fechar a garrafa repetidas vezes para remover alíquotas de água que serão analisadas para diferentes espécies mercuriais, o analista está expondo a amostra repetidas vezes, o que pode resultar em contaminação da mesma (Parker e Bloom 2005). Isso é especialmente importante quando as amostras são preservadas com ácidos ou soluções oxidantes porque elas se tornam eficientes capturadoras de Hg, convertendo o Hg⁰ a Hg²⁺ (Parker e Bloom 2005). Além da possibilidade de contaminação, o uso de uma única garrafa para a quantificação de diversas espécies mercuriais pode gerar a super-estimativa do HgT (Parker e Bloom 2005). Isso pode ocorrer porque se uma quantidade considerável da amostra for removida da garrafa para as demais análises, o Hg adsorvido às paredes da garrafa será solubilizado quando a amostra for oxidada para a análise de HgT e irá incrementar a concentração do líquido restante na garrafa (a razão parede/amostra será maior). Estes dois problemas são resolvidos facilmente com a coleta de uma garrafa para cada espécie que se quer avaliar ou ainda com a coleta de água destinada à análise de HgT em uma garrafa separada daquela coletada para as demais espécies mercuriais alvo.

O BrCl pode não ser um oxidante adequado para amostras que contenham alta concentração de material particulado em suspensão, sendo a oxidação com 3 H₂O: 2 HCl: 1 HNO₃ (v/v) mais eficiente neste tipo de amostra (Marins *et al.* 2002). Outras formas de oxidação podem ser utilizadas para a preservação do HgT na água, como por exemplo, permanganato de potássio e persulfato de potássio (Leopold *et al.* 2010, Montgomery *et al.* 1995). Se garrafas do tipo PET forem utilizadas para a coleta e armazenamento da água, as amostras podem ser preservadas congeladas a -18 °C, devendo ser analisadas em até 40 dias (Fadini e Jardim 2000). A escolha da preservação vai depender da análise química e equipamento de detecção que serão utilizados posteriormente.

A não contaminação do reagente que será adicionado à amostra para a preservação do HgT é muito importante. Isso porque, ao contrário dos redutores, a descontaminação do reagente oxidante é complexa. É importante verificar com o fabricante qual é a concentração de Hg no reagente. Há reagentes ultra-puros disponíveis no mercado, mas eles têm alto custo. Para descontaminar os ácidos, a destilação *sub-boiling* é uma opção frequentemente utilizada pelos laboratórios que possuem um destilador para este fim. Uma alternativa econômica e simples para destilação de ácido por via isotérmica é descrita em Campos *et al.* (2002). Esta

pode ser feita em laboratório e foi eficiente para diminuir as concentrações de cobre no ácido destilado (Campos *et al.* 2002), mas não foi testada quanto aos níveis de Hg, deixando em aberto uma possível alternativa que pode ser utilizada pelos laboratórios que não possuem ácidos ultra-puros e destiladores *sub-boiling*.

Filtração

As amostras de água podem ser filtradas no momento da coleta (com filtros adaptados à garrafa ou bomba coletora), após a coleta no laboratório de campo, ou no laboratório de análises até dias depois da coleta. O método EPA-1669 (1996) recomenda que a filtração seja feita em laboratório sob capela de fluxo laminar ou em uma sala classe 100 para evitar o risco de contaminação nas condições de campo. No entanto, a decisão de quando e onde a amostra será filtrada depende das condições de campo, do tipo de água coletada e da espécie mercurial alvo. Por exemplo, se a campanha amostral for muito longa e não há possibilidade logística de envio do material para o laboratório, a equipe deverá filtrar a água no momento da coleta ou no laboratório de campo. Os cuidados que evitam a contaminação das amostras em campo, discutidos nas seções anteriores, também são válidos para a filtração.

Se a filtração não ocorrer no momento da coleta, garrafas de vidro ou de PTFE devem ser utilizadas para armazenar a amostra até o momento da filtração no laboratório (Parker e Bloom 2005). Estas amostras devem permanecer no escuro e resfriadas para evitar a degradação do MeHg e a dessorção do Hg do material particulado para a solução (Campos *et al.* 2002, Parker e Bloom 2005). Mesmo nestas condições de preservação, não há um consenso sobre o tempo que a razão Hg dissolvido/associado ao material particulado permanece preservada. As amostras podem ficar estáveis somente 1-2 dias ou semanas dependendo do tipo de água coletada (Parker e Bloom 2005). Enquanto que amostras de água doce oxigenadas ficaram estáveis por mais de uma semana, águas anóxicas e sub-óxicas perderam até 99% do Hg dissolvido para as paredes da garrafa 12 h após a coleta (Parker e Bloom 2005), portanto, estas últimas devem ser filtradas no momento da coleta, especialmente se o HgT na fração dissolvida for a espécie-alvo. Águas destinadas à filtração para análise de MeHg ficaram estáveis de 1 dia a semanas dependendo da atividade microbiana da amostra (Parker e Bloom 2005).

Filtros feitos de diferentes materiais (*e.g.*, PTFE, Nylon, acetato de celulose, fibra de vidro ou quartzo) e porosidades podem ser utilizados dependendo do objetivo da coleta. O método EPA-1631 (2002) recomenda que a água seja filtrada através de um filtro com porosidade de 0,45 μm para avaliar o Hg dissolvido. Para escolher o tipo de filtro, deve-se avaliar custo, disponibilidade com a porosidade necessária e como aquele tipo de filtro pode ser descontaminado antes do uso. A reutilização dos filtros não é recomendada porque o risco da limpeza e descontaminação não serem eficientes é maior que os custos de comprar novos filtros (EPA-1669 1996).

Filtros de fibra de vidro e quartzo podem ser descontaminados aquecendo os mesmos a 400 °C por algumas horas. No entanto, com a mesma porosidade e tamanho, os filtros de quartzo são cerca de 10 vezes mais caros que os de fibra de vidro. Portanto, se não há uma necessidade específica para utilizar o quartzo, os filtros de fibra de vidro podem ser utilizados em substituição com um custo muito menor. Campos *et al.* (2002) verificaram que a descontaminação do filtro pela filtração de 50 mL de HCl 1 mol.L⁻¹ seguida de 100 mL de água ultra-pura é eficiente para Cu. O Hg não foi testado, no entanto, é plausível que também seja eficiente. Somente com a análise de amostras-branco esta eficiência pode ser verificada. Este procedimento é prático porque pode ser feito em campo, sem a necessidade de um tratamento prévio do filtro como a calcinação. No entanto, se o objetivo for analisar o filtro contendo o material particulado, esta limpeza possivelmente não será eficiente, pois as bordas do filtro presas ao sistema de filtração não seriam lavadas.

A filtração deve seguir a metodologia mão suja/mão limpa (EPA-1669 1996). O mão limpa realiza todas as etapas de filtração e contato com a amostra e o filtro. O mão suja auxilia nos procedimentos que não tocam na amostra e filtros, como por exemplo, abrir o saco externo que contém a garrafa da amostra e manusear a bomba de filtração. No momento da filtração, é aconselhável filtrar aproximadamente 50 mL de água da amostra para enxaguar filtro, sistema de filtração e garrafa que receberá a água filtrada; descartar esta água; e prosseguir com a filtração que será armazenada para análise (EPA-1669 1996). Este enxague não pode ser realizado quando objetiva-se analisar o filtro, pois qualquer água filtrada vai depositar partículas no filtro e, portanto, todo volume filtrado deve ser contabilizado no cálculo de concentração final. Após a filtração, a água deve ser preservada e armazenada de acordo com os procedimentos citados nas seções anteriores (EPA-1631 2002). Antes da filtração, nenhum preservante deve ser adicionado à amostra porque isto poderia causar a coagulação de moléculas dissolvidas, alterando a razão dissolvido/particulado. Quando o

objetivo é analisar os filtros, estes devem ser armazenados congelados em sacos plásticos limpos e novos.

CONTROLE DE QUALIDADE

O único meio de medir a eficiência da coleta sem contaminação é através da análise de amostras nomeadas como branco (EPA-1669 1996). Brancos são amostras-controle que seguem o mesmo protocolo de preparação das amostras, com a diferença de haver água ultra-pura ao invés de amostra de água. A análise de brancos é um ponto importante na determinação de mercúrio em concentrações baixas, como aquelas presentes no ambiente (EPA-1631 2002). Inúmeras fontes, como por exemplo, poeira e fumaça, podem contaminar as amostras de água destinadas às análises de HgT. Portanto, os laboratórios precisam estar sempre atentos à necessidade de mudar procedimentos e atitudes para evitar a contaminação desse tipo de amostra. Por outro lado, problemas de contaminação das amostras destinadas às análises de MeHg são bem raros.

O requerimento mínimo de brancos que devem ser feitos para validar a preparação das garrafas, coleta, preservação e armazenamento das amostras inclui o branco da garrafa, branco de equipamento e branco de campo (EPA-1669 1996). Estes brancos são independentes do método analítico empregado para a detecção e quantificação do mercúrio. Durante os procedimentos analíticos, é necessário fazer outros diferentes tipos de branco como forma de controle da contaminação sobre o método empregado como, por exemplo, o branco do sistema, de reagente e do método (EPA-1631 2002). Estes últimos não são discutidos porque não fazem parte do escopo do presente trabalho, que discute todas as etapas anteriores à análise da amostra.

O branco de garrafa foi discutido anteriormente; em resumo, ele visa verificar a limpeza da garrafa antes da coleta (EPA-1630 2001). O branco de equipamento é utilizado para verificar se o equipamento de coleta é livre de contaminação (EPA-1669 1996). Qualquer equipamento utilizado na coleta da água deve ser previamente testado (EPA-1669 1996). No laboratório, após preparar o equipamento de coleta, os coletores devem processar água ultra-pura no equipamento utilizando exatamente os mesmo procedimentos que serão usados em campo, como por exemplo, manuseando água e equipamento através da técnica do mão suja/mão limpa (EPA-1669 1996). Esta água não deve ter concentração maior ou igual

que a concentração mínima de quantificação do método ou não deve ser maior que um quinto da concentração das amostras, o que for maior, para que o equipamento seja considerado próprio para o uso (EPA-1669 1996).

O branco de campo é utilizado para verificar se houve contaminação da amostra durante a coleta ou seu processamento. Para fazer um branco de campo, água ultra-pura deve ser transportada para campo em um recipiente adequado e deve então passar pelas mesmas etapas que a amostra, como, por exemplo, ser manuseada no equipamento de coleta, armazenada em uma garrafa, pré-processada, preservada com os mesmos reagentes e temperatura, transportada nas mesmas condições e, por fim, analisada como se fosse uma amostra (EPA-1669 1996). O branco de campo para coleta de água de chuva pode ser feito expondo no campo o funil acoplado à garrafa de coleta por cerca de um minuto, visto que o tempo de exposição deve ser curto para evitar a deposição de material particulado da atmosfera e, em seguida, despejar sobre todo o diâmetro do funil, água ultra-pura no volume médio de chuva coletado para aquela região (Campos *et al.* 2002). Os limites aceitáveis de contaminação do branco de campo são os mesmos que os do branco de equipamento (EPA-1669 1996). Ao menos um branco de campo deve ser processado a cada 10 amostras coletadas em um local (EPA-1631 2002).

Para avaliar a precisão da amostragem, réplicas de campo são necessárias (EPA-1669 1996). Estas consistem em duas amostras de água do mesmo local coletadas simultaneamente, ou em uma rápida sucessão (EPA-1669 1996), para que as condições não mudem evitando que tenhamos duas amostras naturalmente diferentes (e não por erro de amostragem, que é o que se quer avaliar). Ao menos uma réplica de campo deve ser feita a cada 10 amostras coletadas em um local (EPA-1631 2002).

Uma importante ferramenta de avaliação da qualidade do processamento e análise de amostras pelos laboratórios são os programas de intercomparação laboratorial. A participação do laboratório neste tipo de programa é essencial para que se possa ter uma avaliação dos procedimentos empregados pelo laboratório na análise de uma espécie química de Hg em um tipo de matriz específica. Atualmente, existe um programa de intercomparação para análise de HgT e MeHg em água promovido por uma empresa fabricante de equipamentos, Brooks Rand[®] (Creswell *et al.* 2013); no entanto, para participar, o laboratório tem um custo que é associado ao transporte das águas até sua base. Além deste, é importante que programas de intercalibração sejam desenvolvidos entre laboratórios brasileiros que utilizam técnicas diferentes para o processamento e análise das espécies mercuriais em água. Com isso, os laboratórios podem avaliar e ajustar as condições para obter resultados confiáveis e livres de

contaminação. Bastos *et al.* (1998) realizaram uma intercomparação entre diferentes laboratórios brasileiros para análise de Hg em amostras biológicas e geológicas; mas para água não há, atualmente, nenhum programa brasileiro.

CONCLUSÃO

Atualmente é possível analisar diferentes espécies mercuriais em águas naturais devidos aos baixos limites de detecção dos atuais equipamentos analíticos. Isto permite importantes avanços no entendimento do ciclo desse elemento, incluindo sua bioacumulação pela biota. Concomitantemente ao avanço das técnicas analíticas, houve o desenvolvimento de eficientes métodos de preservação da especiação química e do controle da contaminação das amostras, que permitiram a execução de resultados confiáveis mesmo em águas prístinas. É necessário escolher criteriosamente cada etapa a ser seguida, como a escolha do tipo de frasco de coleta e sua descontaminação, do tipo de preservação, de armazenamento e transporte, rotina de atividades em campo e no laboratório. Estas escolhas vão depender da qualidade da amostra de água que se objetiva analisar, das espécies mercuriais alvo, da dinâmica de coleta, e da disponibilidade de equipamentos, de pessoal e financeira. No Brasil, muitos trabalhos têm sido realizados nos últimos anos com a quantificação de diferentes espécies de Hg em água. Muitos laboratórios brasileiros têm inserido a análise de Hg em água em sua rotina, mas alguns desafios ainda são importantes e, muitas vezes limitam a quantidade de amostras ou de espécies químicas possíveis de ser analisadas, como, por exemplo, a falta de estrutura laboratorial, de recursos financeiros e de pessoal qualificado, disponibilidade de alguns materiais no mercado brasileiro e elevados custos de importação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro do CNPq, FAPEAM e CAPES.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azevedo, F. A. 2003. Toxicologia do mercúrio. 292p., 1st ed. Editora Rima, São Carlos.
- Bastos, W. R., O. Malm, W. C. Pfeiffer, and D. Cleary. 1998. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. *Ciência e Cultura* 50:255–260.
- Bisinoti, M. C. 2005. Biogeoquímica aquática do mercúrio orgânico na bacia do rio Negro, Amazônia. Universidade Estadual de Campinas. <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000364797>
- Bloom, N. S. 2000. Analysis and stability of mercury speciation in petroleum hydrocarbons. *Fresenius' Journal Analytical Chemistry* 366(5):438–443.
- Bloom, N. S. 1994. Influence of analytical conditions on the observed “reactive mercury” concentrations in natural fresh waters. Pages 541–552 in C. Watras and J. Hackabee, editors. *Mercury Pollution Integration and Synthesis*. 1st edition. Lewis, Boca Raton, USA.
- Brigham, M. E., D. A. Wentz, G. R. Aiken, and D. P. Krabbenhoft. 2009. Mercury cycling in stream ecosystems. 1. Water column chemistry and transport. *Environmental Science and Technology* 43(8):2720–2725.
- Campos, M. L. A. M., A. Bendo, and F. C. Viel. 2002. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. *Química Nova* 25(5):808–813.
- Chester, R. 1990. *Marine Geochemistry*. 698p., 1st ed. Unwin Hyman, London.
- Copeland, D. D., M. Facer, R. Newton, and P. J. Walker. 1996. Use of poly(ethylene terephthalate) plastic bottles for the sampling, transportation and storage of potable water prior to mercury determination. *The Analyst* 121:173–176.
- Coquery, M., D. Cossa, and J. Sanjuan. 1997. Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries. *Marine Chemistry* 58(1):213–227.
- Creswell, J., V. Engel, A. Carter, and C. Davies. 2013. 2013 Brooks Rand Labs Interlaboratory Comparison Study for Total Mercury and Methylmercury (Intercomp 2013). 51p. Brooks Rand Labs, Seattle.
- EPA-1669. 1996. Sampling ambient water for trace metals at EPA water quality criteria levels. 33p. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- EPA-1630. 2001. Methyl mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS. 41p. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

- EPA-1631. 2002. Method 1631, revision E: Mercury in water by oxidation, purge and trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. 38p. U. S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Fadini, P. S., and W. F. Jardim. 2000. Storage of natural water samples for total and reactive mercury analysis in PET bottles. *The Analyst* 125:549–551.
- Fadini, P. S., and W. F. Jardim. 2001. Is the Negro river basin (Amazon) impacted by naturally occurring mercury? *The Science of the Total Environment* 275:71–82.
- Fitzgerald, W. F. 1986. Cycling of mercury between the atmosphere and oceans. Pages 363–408 in P. Buat-Ménard, editor. *The Role of Air-Sea Exchange in Geochemical Cycling*. 1st edition. D. Reidel Publishing, Dordrecht, Holland.
- Fu, X., X. Feng, R. Yin, and H. Zhang. 2013. Diurnal variations of total mercury, reactive mercury, and dissolved gaseous mercury concentrations and water/air mercury flux in warm and cold seasons from freshwaters of southwestern China. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(10):2256–2265.
- Gill, G. A., and W. F. Fitzgerald. 1987. Picomolar mercury measurements in seawater and other materials using stannous chloride reduction and two-stage gold amalgamation with gas phase detection. *Marine Chemistry* 20(3):227–243.
- Heiden, R. W., and D. A. Aikens. 1979. Pretreatment of polyolefin bottles with chloroform and aqua regia vapor to prevent losses from stored trace mercury (II) solutions. *Analytical Chemistry* 51(1):151–156.
- Kasper, D., D. Botaro, E. F. A. Palermo, and O. Malm. 2007. Mercúrio em peixes-fontes e contaminação. *Oecologia Brasiliensis* 11(2):228–239.
- Kasper, D., B. R. Forsberg, J. H. F. Amaral, R. P. Leitão, S. S. Py-Daniel, W. R. Bastos, and O. Malm. 2014. Reservoir stratification affects methylmercury levels in river water, plankton, and fish downstream from Balbina hydroelectric dam, Amazonas, Brazil. *Environmental Science and Technology* 48:1032–1040.
- Kehrig, H. A., T. G. Seixas, A. P. M. Di Benedetto, and O. Malm. 2013. Selenium and mercury in widely consumed seafood from South Atlantic Ocean. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 93:156–162.
- Lechler, P. J., J. R. Miller, L. D. Lacerda, D. Vinson, J. C. Bonzongo, W. B. Lyons, and J. J. Warwick. 2000. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira river basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *The Science of the Total Environment* 260:87–96.

- Leermakers, M., P. Lansens, and W. Baeyens. 1990. Storage and stability of inorganic and methylmercury solutions. *Fresenius' Journal Analytical Chemistry* 336:655–662.
- Leopold, K., M. Foulkes, and P. Worsfold. 2010. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters - a review. *Analytica Chimica Acta* 663:127–138.
- Magarelli, G. 2006. Fluxos de mercúrio gasoso na interface solo/atmosfera na bacia do rio Negro utilizando câmaras dinâmicas de fluxo. Universidade Estadual de Campinas. <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtIs000380299.pdf>
- Marins, R. V., H. H. M. Paraquetti, and G. A. Ayres. 2002. Alternativa analítica para especiação físico-química de mercúrio em águas costeiras tropicais. *Química Nova* 25(3):372–378.
- Mason, R. P., and W. F. Fitzgerald. 1990. Alkylmercury species in the equatorial Pacific. *Nature* 347:457–459.
- Mason, R. P., and W. F. Fitzgerald. 1991. Mercury speciation in open ocean waters. *Water, Air and Soil Pollution* 56:779–789.
- Montgomery, S., A. Mucci, M. Lucotte, and P. Pichet. 1995. Total dissolved mercury in the water column of several natural and artificial aquatic systems of Northern Quebec (Canada). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52:2483–2492.
- O'Driscoll, N. J., S. Beauchamp, S. D. Siciliano, A. N. Rencz, and D. R. S. Lean. 2003. Continuous analysis of dissolved gaseous mercury (DGM) and mercury flux in two freshwater lakes in Kejimikujik Park, Nova Scotia: evaluating mercury flux models with quantitative data. *Environmental Science and Technology* 37:2226–2235.
- Padovani, C. R., B. R. Forsberg, and T. P. Pimentel. 1995. Contaminação mercurial em peixes do rio Madeira: resultados e recomendações para consumo humano. *Acta Amazonica* 25:127–136.
- Parker, J. L., and N. S. Bloom. 2005. Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation. *Science of the Total Environment* 337:253–263.
- Sañudo-Wilhelmy, S. A., A. Tovar-Sanchez, N. S. Fisher, and A. R. Flegal. 2004. Examining dissolved toxic metals in U.S. estuaries. *Environmental Science and Technology* 38(2):34A–38A.
- Sellers, P., C. A. Kelly, J. W. M. Rudd, and A. R. MacHutchon. 1996. Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature* 380:694–697.
- Silva, G. S., W. F. Jardim, and P. S. Fadini. 2009. Photochemical dissolved gaseous mercury (DGM) formation/consumption in the Negro river basin, Brazilian Amazon. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20(8):1549–1555.

Stoeppler, M., and W. Matthes. 1978. Storage behaviour of inorganic mercury and methylmercury chloride in sea water. *Analytica Chimica Acta* 98(2):389–392.

Tseng, C. M., P. H. Balcom, C. H. Lamborg, and W. F. Fitzgerald. 2003. Dissolved elemental mercury investigations in long island sound using on-line Au amalgamation-Flow injection analysis. *Environmental Science and Technology* 37(6):1183–1188.

Vandal, G. M., R. P. Mason, and W. F. Fitzgerald. 1991. Cycling of volatile mercury in temperate lakes. *Water Air and Soil Pollution* 56:791–803.

Windom, H. L., J. T. Byrd, R. G. Smith, and F. Huan. 1991. Inadequacy of NASQAN data for assessing metal trends in the Nations's rivers. *Environmental Science and Technology* 25:1137–1142.

Yu, L.-P., and X.-P. Yan. 2003. Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage. *Trends in Analytical Chemistry* 22(4):245–253.

TABELA

Tabela1. Vantagens e desvantagens da utilização de garrafas de vidro, politetrafluoretileno (PTFE) e politereftalato de etileno (PET) para a coleta e armazenamento de amostras de água destinadas às análises de diferentes espécies químicas mercuriais.

Tipo	Vantagens	Desvantagens
Vidro	<p>Pode ser reutilizada</p> <p>Menor custo (comparada à garrafa de PTFE)</p> <p>Existe na cor âmbar (auxilia na proteção das amostras da luz solar)</p> <p>Permite armazenamento da amostra por mais tempo (comparada à garrafa PET)</p> <p>Pode ser reutilizada</p> <p>Leve (facilita transporte)</p> <p>Resistente</p> <p>Permite armazenamento da amostra por mais tempo (comparada à garrafa PET)</p>	<p>Protocolos de limpeza exaustivos (exige reagentes, tempo de pessoal e espaço laborat</p> <p>Pouco disponível no Brasil com tampas ou batoques de PTFE</p> <p>Frágil e pesada</p> <p>Protocolos de limpeza exaustivos (exige reagentes, tempo de pessoal e espaço laborat</p> <p>Custo mais elevado</p> <p>É a menos disponível no mercado brasileiro</p>
PTFE	<p>Dispensa protocolos de limpezas exaustivos e dispendiosos</p> <p>Resistente</p> <p>Custo muito baixo e amplamente disponível no Brasil</p> <p>Leve (facilita transporte)</p> <p>São descartadas após o uso, evitando a contaminação cruzada</p>	<p>Tempo de armazenamento desde a coleta até a análise deve ser muito curto</p> <p>Validada para poucas espécies mercuriais</p>
PET		

FIGURA

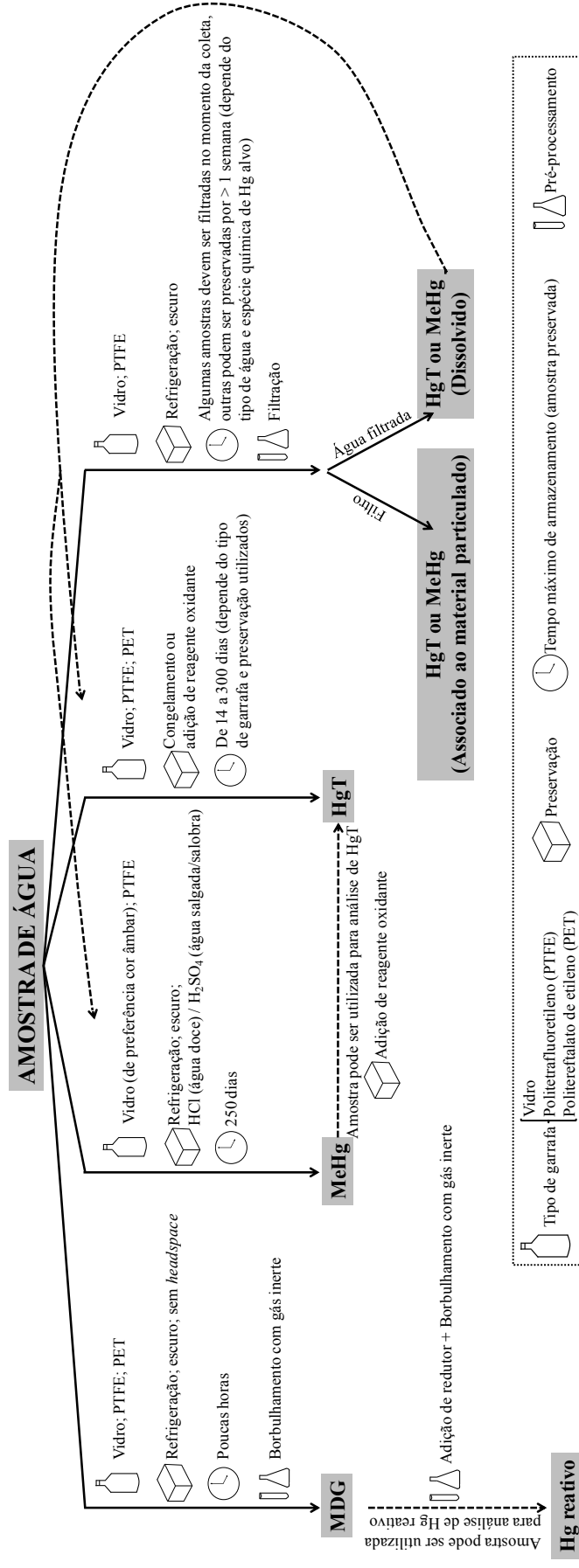


Figura 1. Resumo esquemático da metodologia que pode ser utilizada desde a coleta até o pré-processamento das amostras de água destinadas à análise das espécies químicas denominadas como mercúrio dissolvido gasoso (MDG), mercúrio reativo (Hg reativo), metilmercúrio (MeHg), mercúrio total (HgT) e o mercúrio associado ao material particulado ou dissolvido na água. Detalhes da metodologia são discutidos ao longo do texto.

SÍNTESE

As concentrações de MeHg na água foram influenciadas pela sazonalidade, tanto nos sistemas fluviais amazônicos naturais quanto no reservatório de Balbina. Nos ambientes naturais, o pulso de inundação dos rios alagou extensas áreas criando ambientes propícios à metilação do mercúrio. Conseqüentemente, altas concentrações de MeHg foram observadas durante a estação de cheia. No reservatório de Balbina, a principal influência da sazonalidade ocorreu sobre o padrão de estratificação da coluna d'água. Esta estratificação criou um hipolimnio que apresentou condições propícias à metilação, o que foi confirmado ao observar maiores concentrações de MeHg na água desta camada quando comparadas àquelas do epilimnio.

A sazonalidade ainda influenciou na dinâmica do mercúrio à jusante da barragem, uma vez que altas concentrações de MeHg foram observadas na água e no plâncton à jusante somente quando o reservatório estava estratificado. Em geral, as concentrações na água diminuíram gradualmente até aproximadamente 200 km de distância da barragem. Organismos zooplancônicos e peixes piscívoros apresentaram maiores concentrações de mercúrio à jusante do que à montante da barragem, demonstrando que o MeHg exportado pela barragem está sendo acumulado pela biota.

Tanto no sistema fluvial natural quanto naquele impactado pela barragem, a principal variável preditora do MeHg foi o oxigênio dissolvido na água. Este apresentou uma correlação negativa com as concentrações de MeHg na água dos rios e do reservatório. Nos sistemas fluviais naturais, considerando cada estação hidrológica separadamente, diferentes parâmetros limnológicos influenciaram as concentrações de MeHg na água. Oxigênio dissolvido e pH durante a estação de cheia, e temperatura da água e carbono orgânico dissolvido na estação de águas baixas.

Concluimos que as concentrações de MeHg em rios amazônicos e no reservatório de Balbina foram influenciadas pela sazonalidade, e que a concentração de oxigênio dissolvido foi a principal variável preditora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achá, D.; Iñiguez, V.; Roulet, M.; Guimarães, J.R.D.; Luna, R.; Alanoca, L.; Sanchez, S. 2005. Sulfate-reducing bacteria in floating macrophyte rhizospheres from an Amazonian floodplain lake in Bolivia and their association with Hg methylation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 661-665.

Almeida, R. 2012. *Estudo da origem, mobilização e organificação do mercúrio no reservatório da UHE de Samuel, RO*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 119p.

Amyot, M.; Morel, F.M.M.; Ariya, P.A. 2005. Dark oxidation of dissolved and liquid elemental mercury in aquatic environments. *Environmental Science and Technology*, 39: 110-114.

ANA, 2013. Agência Nacional de Águas: Sistema Nacional de Informações sobre Recursos Hídricos (www.ana.gov.br). Acesso em 25/08/2013.

Anderson, M.R.; Scruton, D.A.; Williams, U.P.; Payne, J.F. 1995. Mercury in fish in the Smallwood Reservoir, Labrador, twenty one years after impoundment. *Water, Air and Soil Pollution*, 80: 927-930.

Anderson, M.R. 2011. Duration and extent of elevated mercury levels in downstream fish following reservoir creation. *River Systems*, 19 (3): 167-176.

Azevedo, F.A. 2003. *Toxicologia do mercúrio*. 1ra ed. Editora Rima, São Carlos, 292p.

Balogh, S.J.; Nollet, Y.H.; Swain, E.B. 2004. Redox chemistry in Minnesota streams during episodes of increase methylmercury discharge. *Environmental Science & Technology*, 38: 4921-4927.

Barbosa, A.C.; Souza, J.; Dórea, J.G.; Jardim, W.F.; Fadini, P.S. 2003. Mercury biomagnifications in a tropical black water, rio Negro, Brazil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45: 235-246.

Barbosa, P.M. 2013. *Avaliação do fluxo difusivo de metano (CH₄) em ambientes do médio-baixo Solimões*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 88p.

Bastos, W.R.; Malm, O.; Pfeiffer, W.C.; Cleary, D. 1998. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. *Ciência e Cultura*, 50: 255-260.

Belger, L.; Forsberg, B.R. 2006. Factors controlling Hg levels in two predatory fish species in the Negro river basin, Brazilian Amazon. *Science of the Total Environment*, 367: 451-459.

Benoit, W.R.; Gilmour, C.C.; Mason, R.P.; Riedel, G.S.; Riedel, G.F. 1998. The sources and cycling of mercury in the Patuxent estuary. *Biogeochemistry*, 40: 249-265.

Benoit, J.M.; Mason, R.P.; Gilmour, C.C.; Aiken, G.R. 2001. Constants for mercury binding by dissolved organic matter isolated from the Florida Everglades. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 65: 4445-4451.

Bermann, C. 2002. *Energia no Brasil: para quê? Para quem? Crise e alternativas para um país sustentável*. 2da ed. Livraria da Física, São Paulo, 139p.

Bisinoti, M.C. 2005. *Biogeoquímica aquática do mercúrio orgânico na bacia do rio Negro, Amazônia*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 169p.

Bisinoti, M.C.; Júnior, E.S.; Jardim, W.F. 2007. Seasonal behavior of mercury species in waters and sediments from the Negro river basin, Amazon, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18: 544-553.

Bloom, N.S. 1994. Influence of analytical conditions on the observed “reactive mercury” concentrations in natural fresh waters. In: Watras, C.; Hackabee, J. (Eds.). *Mercury Pollution Integration and Synthesis*. Lewis, Boca Raton, USA, p.541-552.

Bloom, N.S. 2000. Analysis and stability of mercury speciation in petroleum hydrocarbons. *Fresenius' Journal Analytical Chemistry*, 366 (5): 438-443.

Borzongo, J.C.J.; Heim, K.J.; Chen, Y.; Lyons, W.B.; Warwick, J.J.; Miller, G.C. 1996. Hg pathways in the Carson River–Lahontan Reservoir system, Nevada, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 677-683.

Bradley, P.M.; Burns, D.A.; Murray, K.R.; Brigham, M.E.; Button, D.T.; Chasar, L.C.; Marvin-DiPasquale, M.; Lowery, M.A.; Journey, C.A. 2011. Spatial and seasonal variability of dissolved methylmercury in two stream basins in the eastern United States. *Environmental Science & Technology*, 45: 2048-2055.

Branfireun, B.A.; Heues, A.; Roulet, N.T. 1996. The hydrology and methylHg dynamics of Precambrian shield headwater peatland. *Water Resources Research*, 32: 1785-1794.

Brigham, M.E.; Wentz, D.A.; Aiken, G.R.; Krabbenhoft, D.P. 2009. Mercury cycling in stream ecosystems. 1. Water column chemistry and transport. *Environmental Science & Technology*, 43: 2720-2725.

Brinkman, W.L.F.; Santos, U.M. 1974. The emission of biogenic hydrogen sulfide from Amazonian floodplain lakes. *Tellus*, 26: 261-267.

Brinkmann, L.; Rasmussen, J.B. 2010. High levels of mercury in biota of a new Prairie irrigation reservoir with a simplified food web in Southern Alberta, Canada. *Hydrobiologia*, 641: 11-21.

Campos, M.L.A.M.; Bendo, A.; Viel, F.C. 2002. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. *Química Nova*, 25 (5): 808-813.

Canavan, C.M.; Caldwell, C.A.; Bloom, N.S. 2000. Discharge of methylmercury-enriched hypolimnetic water from a stratified reservoir. *Science of the Total Environment*, 260: 159-170.

Chester, R. 1990. *Marine Geochemistry*. Unwin Hyman, London, 698p.

Claro Jr, L.H. 2003. *A influência da floresta alagada na estrutura trófica de comunidades de peixes em lagos de várzea da Amazônia Central*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 61p.

Compeau, G.; Bartha, R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 498-502.

Copeland, D.D.; Facer, M.; Newton, R.; Walker, P.J. 1996. Use of poly(ethylene terephthalate) plastic bottles for the sampling, transportation and storage of potable water prior to mercury determination. *The Analyst*, 121: 173-176.

Coquery, M.; Cossa, D.; Sanjuan, J. 1997. Speciation and sorption of mercury in two macro-tidal estuaries. *Marine Chemistry*, 58 (1): 213-227.

Coquery, M.; Cossa, D.; Peretyazhko, T.; Azemard, S.; Charlet, L. 2003. Methylmercury formation in the anoxic waters of the Petit-Saut reservoir (French Guiana) and its spreading in the adjacent Sinnamary River. *Journal Physique IV*: 107: 327-331.

Creswell, J.; Engel, V.; Carter, A.; Davies, C. 2013. *2013 Brooks Rand Labs Interlaboratory Comparison Study for Total Mercury and Methylmercury (Intercomp 2013)*. Brooks Rand Labs, Seattle, 51p.

Cruz, S.V. 2012. *Alimentação de species piscívoras do gênero Cichla spp., no Reservatório de Balbina Município de Presidente Figueiredo/AM*. Relatório PIBIC, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 30p.

Dominique, Y.; Maury-Brachet, R.; Muresan, B.; Vigouroux, R.; Richard, S.; Cossa, D.; Mariotti, A.; Boudou, A. 2007. Biofilm and mercury availability as key factors for mercury

accumulation in fish (*Curimata cyprinoids*) from a disturbed amazonian freshwater system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26 (1): 45-52.

Durrieu, G.; Maury-Brachet, R.; Boudou, A. 2005. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60: 315-323.

Dyrssen, D.; Wedborg, M. 1991. The sulfur–mercury (II) system in natural waters. *Water, Air and Soil Pollution*, 56: 507-519.

EPA 1669 (U.S. Environmental Protection Agency). 1996. *Method 1669, sampling ambient water for trace metals at EPA water quality criteria levels*. Engineering and Analysis Division, Washington, 33p.

EPA 1630 (U.S. Environmental Protection Agency). 2001. *Method 1630, methyl mercury in water by distillation, aqueous ethylation, purge and trap, and CVAFS*. Engineering and Analysis Division, Washington, 41p.

EPA 1631 (U.S. Environmental Protection Agency). 2002. *Method 1631, revision E: mercury in water by oxidation, purge and trap, and Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry*. Engineering and Analysis Division, Washington, 38p.

Fadini, P.S.; Jardim, W.F. 2000. Storage of natural water samples for total and reactive mercury analysis in PET bottles. *The Analyst*, 125: 549-551.

Fadini, P.S.; Jardim, W.F. 2001. Is the Negro river basin (Amazon) impacted naturally occurring mercury? *Science of the Total Environment*, 275: 71-82.

FAO/WHO, 1991. Codex Alimentarius: Guideline Levels for Mercury in Fish (CAC/GL 7-1991). Adopted by the Commission at its Nineteenth Session in Italy 1–10 July 1991 (www.fao.org/docrep/meeting/005/t0490e/t0490e00.htm). Acesso em 15/03/2013.

Figueiredo, M.D.M.A.M.; Laraque, A. 1999. *Balbina, 10 anos depois*. Hydrological and Geochemical Processes in Large Scale River Basins, Manaus, 6p.

Fitzgerald, W.F. 1986. Cycling of mercury between the atmosphere and oceans. In: Buat-Ménard, P. (Ed.). *The Role of Air-Sea Exchange in Geochemical Cycling*. D. Reidel Publishing, Dordrecht, Holland, p.363-408.

Fowler, S.W.; Heyraud, M.; La Rosa, J. 1978. Factors affecting methyl and inorganic mercury dynamics in mussels and shrimp. *Marine Biology*, 46: 267-276.

French, K.J.; Anderson, M.R.; Scruton, D.A.; Ledrew, L.J. 1998. Fish mercury levels in relation to characteristics of hydroelectric reservoirs in Newfoundland, Canada. *Biogeochemistry*, 40: 217-233.

Fu, X.; Feng, X.; Yin, R.; Zhang, H. 2013. Diurnal variations of total mercury, reactive mercury, and dissolved gaseous mercury concentrations and water/air mercury flux in warm and cold seasons from freshwaters of southwestern China. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32 (10): 2256-2265.

Furch, K. 1984. Water chemistry of the Amazon basin: the distribution of chemical elements among freshwater. In: Sioli, H. (Ed.). *The Amazon – limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. Junk Publishers, Dordrecht, South Holland, p.167-199.

Gill, G.A.; Fitzgerald, W.F. 1987. Picomolar mercury measurements in seawater and other materials using stannous chloride reduction and two-stage gold amalgamation with gas phase detection. *Marine Chemistry*, 20 (3): 227-243.

Guimarães, J.R.D.; Roulet, M.; Lucotte, M.; Mergler, D. 2000. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. *Science of the Total Environment*, 261: 91-98.

Heiden, R.W.; Aikens, D.A. 1979. Pretreatment of polyolefin bottles with chloroform and aqua regia vapor to prevent losses from stored trace mercury (II) solutions. *Analytical Chemistry*, 51 (1): 151-156.

Huchabee, J.W.; Elwood, J.W.; Hildebrand, S.C. 1979. Accumulation of mercury in freshwater biota. In: Nriagu, J.O. (Ed.). *The biogeochemistry of mercury in the environment*. Elsevier, Amsterdam, Dutch, p.277-302.

Hurley, J.P.; Krabbenhoft, D.P.; Babiarz, C.L.; Andren, A.W. 1994. Cycling of mercury across sediment–water interface in seepage lakes. In: Baker, L.A. (Ed.). *Environmental Chemistry of Lakes and Reservoirs*. American Chemical Society Publishing, Washington, p.425-449.

Horie, C.A.C. 2013. *Biologia reprodutiva e estrutura da população do tucunaré Cichla vazzoleri (Perciformes: Cichlidae) no reservatório da hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 71p.

Ikingura, J.R.; Akagi, H. 2003. Total mercury and methylmercury in fish from hydroelectric reservoirs in Tanzânia. *The Science of Total Environment*, 304: 355-368.

INMET, 2013. Instituto Nacional de Meteorologia (www.inmet.gov.br). Acesso em 20/08/2013.

Internationalrivers, 2013. (www.internationalrivers.org). Acesso em 20/05/2013.

Jardim, W.F.; Bisinoti, M.C.; Fadini, P.S.; Silva, G.S. 2010. Mercury redox chemistry in the Negro river basin, Amazon: the role of organic matter and solar light. *Aquatic Geochemistry*, 16: 267-278.

Junk, W.J.; Bayley, P.B.; Sparks, R.E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge, D.P. (Ed.). *Proceedings of the International Large River Symposium*, p.110-127.

Junk, W.J. 1993. Wetlands of tropical South America. In: Whigham, D.F.; Dykyjová, D.; Hejny, S. (Ed.). *Wetlands of the World I: inventory, ecology and management*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, South Holland, p.679-739.

Kasper, D.; Botaro, D.; Palermo, E.F.A.; Malm, O. 2007. Mercúrio em peixes-fontes e contaminação. *Oecologia Brasiliensis*, 11 (2): 228-239.

Kasper, D.; Palermo, E.F.A.; Branco, C.W.C.; Malm, O. 2012. Evidence of elevated mercury levels in carnivorous and omnivorous fishes downstream from an Amazon reservoir. *Hydrobiologia*, 694: 87-98.

Kasper, D.; Forsberg, B.R.F.; Amaral, J.H.F.; Leitão, R.P.; Py-Daniel, S.S.; Bastos, W.R.; Malm, O. 2014. Reservoir stratification affects methylmercury levels in river water, plankton, and fish downstream from Balbina hydroelectric dam, Amazonas, Brazil. *Environmental Science and Technology*, 48: 1032-1040.

Kehrig, H.A.; Malm, O.; Akagi, H.; Guimarães, J.R.D.; Torres, J.P.M. 1998. Methylmercury in fish and hair samples from the Balbina reservoir, Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 77: 84-90.

Kehrig, H.A.; Seixas, T.G.; Di Benedetto, A.P.M.; Malm, O. 2013. Selenium and mercury in widely consumed seafood from South Atlantic Ocean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 93: 156-162.

Kemenes, A.; Forsberg, B.R.; Melack, J.M. 2007. Methane release below a tropical hydroelectric dam. *Geophysical Research Letters*, 34, GL 029479.

Kuwabara, J.S.; Topping, B.R.; Moon, G.E.; Husby, P.; Lincoff, A.; Carter, J.L.; Croteau, M.N. 2005. *Mercury accumulation by lower trophic-level organisms in lentic systems within the Guadalupe river watershed, California*. U.S. Geological Survey, California, 29p.

Lechler, P.J.; Miller, J.R.; Lacerda, L.D.; Vinson, D.; Bozongo, J.C.; Lyons, W.B.; Warwick, J.J. 2000. Elevated mercury concentrations in soils, sediments, water, and fish of the Madeira river basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? *Science of the Total Environment*, 260: 87-96.

Leermakers, M.; Lansens, P.; Baeyens, W. 1990. Storage and stability of inorganic and methylmercury solutions. *Fresenius' Journal Analytical Chemistry*, 336: 655-662.

Leite, R.G. 1987. *Alimentação e hábitos alimentares dos peixes do rio Uatumã, na área de abrangência da usina hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 81p.

Leopold, K.; Foulkes, M.; Worsfold, P. 2010. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters - a review. *Analytica Chimica Acta*, 663: 127-138.

Li, S.; Zhou, L.; Wang, H.; Xiong, M.; Yang, Z.; Hu, J.; Liang, Y.; Chang, J. 2013. Short-term impact of reservoir impoundment on the patterns of mercury distribution in a subtropical aquatic ecosystem, Wujiang River, southwest China. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 4396-4404.

Magarelli, G. 2006. *Fluxos de mercúrio gasoso na interface solo/atmosfera na bacia do rio Negro utilizando câmaras dinâmicas de fluxo*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 122p.

Malm, O.; Pfeiffer, W.C.; Souza, C.M.M.; Reuther, R. 1990. Mercury pollution due to gold mining in the Madeira River Basin, Brazil. *Ambio*, 19: 11-15.

Malm, O.; Castro, M.B.; Bastos, W.R.; Branches, F.J.P.B.; Guimarães, J.R.D.; Zuffo, C.E.; Pfeiffer, W.C. 1995. An assessment of Hg pollution in different goldmining areas, Amazon Brazil. *Science of the Total Environment*, 175: 127-140.

Malm, O. 1998. Gold mining as a source of mercury exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research*, 77: 73-78.

Malm, O.; Palermo, E.F.A.; Santos, H.S.B.; Rebelo, M.F.; Kehrig, H.A.; Oliveira, R.B.; Meire, R.O.; Pinto, F.N.; Moreira, L.P.A.; Guimarães, J.R.D.; Torres, J.P.M.; Pfeiffer, W.C. 2004. Transport and cycling of mercury in Tucuruí reservoir, Amazon, Brazil: 20 years after fulfillment. *RM&Z -Materials and Geoenvironment*, 51: 1195-1198.

Marins, R.V.; Paraquetti, H.H.M.; Ayres, G.A. 2002. Alternativa analítica para especiação físico-química de mercúrio em águas costeiras tropicais. *Química Nova*, 25 (3): 372-378.

Mason, R.P.; Fitzgerald, W.F. 1990. Alkylmercury species in the equatorial Pacific. *Nature*, 347: 457-459.

Mason, R.P.; Fitzgerald, W.F. 1991. Mercury speciation in open ocean waters. *Water, Air and Soil Pollution*, 56: 779-789.

Mason, R.P.; Fitzgerald, W.F.; Morel, F.M.M. 1994. The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 58: 3191-3198.

Matilainen, T.; Verta, M. 1995. Mercury methylation and demethylation in aerobic surface waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 1597-1608.

Mauro, J.B.N.; Guimarães, J.R.D.; Melamed, R. 1999. Hg methylation in a tropical macrophyte: influence of abiotic parameters. *Applied Organometallic Geochemistry*, 13: 631-636.

Melack, J.M.; Wang, Y. 1998. Delineation of flooded area and flooded vegetation in Balbina reservoir (Amazonas, Brazil) with synthetic aperture radar. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 26: 2374-2377.

Melack, J.M.; Hess, L.L. 2010. Remote sensing of the distribution and extent of wetlands in the Amazon basin. In: Junk, W.J.; Piedade, M.; Wittmann, F.; Schöngart, J.; Parolin, P. (Ed.). *Amazonian floodplain forests: Ecophysiology, ecology, biodiversity and sustainable management. Ecological Studies*. Springer Publishing, New York, p.43-59.

Miller, J.C.; Miller, J.N. 1994. *Statistics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood, Great Britain, 233p.

Miskimmin, B.M.; Rudd, J.W.M.; Kelly, C.A. 1992. Influence of dissolved organic carbon, pH and microbial respiration rates on Hg methylation and demethylation in lake water. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49: 17-22.

- Mol, J.H.; Ramlal, J.S.; Lietar, C.; Verloo, M. 2001. Mercury contamination in freshwater, estuarine, and marine fishes in relation to small-scale gold mining in Suriname, South America. *Environmental Research*, 86: 183-197.
- Montgomery, S.; Mucci, A.; Lucotte, M.; Pichet, P. 1995. Total dissolved mercury in the water column of several natural and artificial aquatic systems of Northern Quebec (Canada). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 2483-2492.
- Morrison, K.A.; Therien, N. 1995. Changes in mercury levels in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and northern pike (*Esox lucius*) in the LG-2 reservoir since flooding. *Water, Air and Soil Pollution*, 80: 819-828.
- Mucci, A.; Lucotte, M.; Montgomery, S.; Plourde, Y.; Pichet, P.; Vantra, H. 1995. Mercury remobilization from flooded soils in a hydroelectric reservoir of Northern Quebec, La Grande-2-results of a soil resuspension experiment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 2507-2517.
- Munthe, J. 1992. The aqueous oxidation of elemental mercury by ozone. *Atmospheric Environment*, 26A: 1461-1468.
- Muresan, B.; Cossa, D.; Coquery, M.; Richard, S. 2008. Mercury sources and transformations in a man-perturbed tidal estuary: The Sinnamary Estuary, French Guiana. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72: 5416-5430.
- Muresan, B.; Cossa, D.; Richard, S.; Dominique, Y. 2008. Monomethylmercury sources in a tropical artificial reservoir. *Applied Geochemistry*, 23: 1101-1126.
- Neathery, M.W.; Miller, W.J. 1975. Metabolism and toxicity of cadmium, mercury and lead in animals. *Journal Dairy Science*, 58: 1767-1781.
- Novaes, J.L.C.; Caramaschi, E.P.; Winemiller, K.O. 2004. Feeding of *Cichla monoculus* Spix, 1829 (Teleostei: Cichlidae) during and after reservoir formation in the Tocantins River, Central Brazil. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 16: 41-49.

O'Driscoll, N.J.; Beauchamp, S.; Siciliano, S.D.; Rencz, A.N.; Lean, D.R.S. 2003. Continuous analysis of dissolved gaseous mercury (DGM) and mercury flux in two freshwater lakes in Kejimikujik Park, Nova Scotia: evaluating mercury flux models with quantitative data. *Environmental Science and Technology*, 37: 2226-2235.

Oliveira Jr, A.B. 1998. *Táticas alimentares e reprodutivas do tucunaré-comum (Cichla monoculus, Agassiz, 1813) no reservatório da UHE de Balbina-AM*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 79p.

Padovani, C.R.; Forsberg, B.R.; Pimentel, T.P. 1995. Contaminação mercurial em peixes do rio Madeira: Resultados e recomendações para consumo humano. *Acta Amazônica*, 25: 127-136.

Paiva, M.P. 1983. Impacto das grandes represas sobre o meio ambiente. *Ciência e Cultura*, 35 (9): 1274-1282.

Palermo, E.F.A.; Kasper, D.; Reis, T.S.; Nogueira, S.; Branco, C.W.C.; Malm, O. 2004. Mercury level increase in fish tissues downstream the Tucuruí Reservoir, Brazil. *RM&Z - Materials and Geoenvironment*, 51: 1292-1294.

Palermo, E.F.A. 2008. *Acúmulo e transporte de mercúrio em reservatórios tropicais*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 96p.

Parker, J.L.; Bloom, N.S. 2005. Preservation and storage techniques for low-level aqueous mercury speciation. *Science of the Total Environment*, 337: 253-263.

Pereira, E.L.S. 2011. *Influência das características naturais da bacia de drenagem sobre as propriedades físico-químicas do rio Solimões/Amazonas e seus principais tributários brasileiros*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 42p.

Petrick, F.R. 1993. *Bindung und akkumulation Von quecksilber in den vom goldabbau kontaminierten flubsedimenten des Rio Madeira, Rondônia, Brasilien*. Dissertação de Mestrado, Ludwig Maximilians Universität, Munich, Bavaria, 72p.

Pfeiffer, W.C.; Lacerda, L.D. 1988. Mercury inputs into the Amazon region, Brazil. *Environmental Technology Letters*, 9: 325-330.

Pfeiffer, W.C.; Malm, O.; De Souza, C.M.M.; Lacerda, L.D.; Silveira, E.G. 1990. A ameaça do mercúrio nos garimpos. *Ciência Hoje*, 11 (61): 10-12.

Plourde, Y.; Lucotte, M.; Pichet, P. 1997. Contribution of suspended particulate matter and zooplankton to MeHg contamination of the food chain in midnorthern Quebec (Canada) reservoirs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54: 821-831.

Rabelo, H.; Araújo-Lima, C.A.R.M. 2002. A dieta e o consumo diário de alimento de *Cichla monoculus* na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, 32: 707-724.

RADAM Brasil. 1978. *Folha SA – 20 Manaus: Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra; Levantamento de Recursos Naturais – 18*. Ministério de Minas e Energia/Departamento Nacional da Produção Mineral, Rio de Janeiro, RJ, 628p.

Ramlal, P.S.; Kelly, C.A.; Rudd, J.W.M.; Furutani, A. 1993. Sites of methylmercury production in remote Canadian Shield lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50: 972-979.

REN21. 2009. *Renewables Global Status Report: Update*. GTZ, Paris, 32p.

Rodríguez Zúñiga, U.F. 2006. *Avaliação da influência de fatores ambientais na estrutura, dinâmica e propriedades ópticas das substâncias húmicas aquáticas do rio Negro*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 147p.

Rogers, D.W.; Dickman, M.; HAN, X. 1995. Stories from old reservoirs: sediment Hg and Hg methylation in Ontario hydroelectric developments. *Water, Air and Soil Pollution*, 80: 829-839.

Roulet, M.; Lucotte, M.; Farella, N.; Serique, G.; Coelho, H.; Passos, C.J.S.; Silva, E.J.; Andrade, P.S.; Mergler, D.; Guimarães, J.R.D.; Amorim, M. 1998. Effects of recent human

colonization on the presence of mercury in amazonian ecosystems. *Water, Air and Soil Pollution*, 112: 297-313.

Roulet, M.; Lucotte, M.; Guimarães, J.R.D.; Rheault, I. 2001. Methylmercury in water, seston and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós river, Brazil. *Water, Air and Soil Pollution*, 128: 41-60.

Santos, G.M.; Ferreira, E; Zuanon, J. 2006. *Peixes Comerciais de Manaus*. Editora INPA, Manaus, 141p.

Santos, R.N. 2012. *Estratégias reprodutivas de peixes de um rio impactado por empreendimento hidrelétrico na Amazônia Central*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 103p.

Sañudo-Wilhelmy, S.A.; Tovar-Sanchez, A.; Fisher, N.S.; Flegal, A.R. 2004. Examining dissolved toxic metals in U.S. estuaries. *Environmental Science and Technology*, 38 (2): 34A-38A.

Schetagne, R.; Verdon, R. 1999. Post-impoundment evolution of fish mercury levels at the La Grande Complex, Québec, Canada (from 1978 to 1996). In: Lucotte, M.; Schetagne, R.; Thérien, N.; Langlois, C.; Tremblay, A. (Ed.). *Mercury in the Biogeochemical Cycle*. Springer, Berlin, p.235-258.

Schetagne, R.; Doyon, J.F.; Fournier, J.J. 2000. Export of mercury downstream from reservoirs. *Science of the Total Environment*, 260: 135-145.

Sellers, P.; Kelly, C.A.; Rudd, J.W.M.; MacHutchon, A.R. 1996. Photodegradation of methylmercury in lakes. *Nature*, 380: 694-697.

Silva, G.S.; Jardim, W.F.; Fadini, P.S. 2009. Photochemical dissolved gaseous mercury (DGM) formation/consumption in the Negro river basin, Brazilian Amazon. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(8): 1549-1555.

Silva-Forsberg, M.C.; Forsberg, B.R.; Zeidemann, V.K. 1999. Mercury contamination in humans linked to river chemistry in the Amazon basin. *Ambio*, 28 (6): 519-521.

Sioli, H. 1956. Über Natur und Mensch im brasilianischen Amazonasgebiet. *Erdkunde*, 10 (2): 89-109.

Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: hydrography, morphology of the river courses and river types. In: Sioli, H. (Ed.). *The Amazon – limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. Junk Publishers, Dordrecht, South Holland, p.127-165.

Stallard, R.F.; Edmond, J.M. 1983. Geochemistry of the Amazon 2: the influence of geology and weathering environment on the dissolved load. *Journal of Geophysical Research*, 88: 9671-9688.

Stallard, R.F. 1985. River chemistry, geology, geomorphology, and soils in the Amazon and Orinoco basins. In: Drever, J.I. (Ed.). *The Chemistry of Weathering*. Dr. Reidel Publishers Co, Boston, p.293-316.

Stewart, A.R.; Saiki, M.K.; Kuwabara, J.S.; Alpers, C.N.; Marvin-DiPasquale, M.; Krabbenhoft, D.P. 2008. Influence of plankton mercury dynamics and trophic pathways on mercury concentrations of top predator fish of a mining-impacted reservoir. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 65: 2351-2366.

Stoeppler, M.; Matthes, W. 1978. Storage behaviour of inorganic mercury and methylmercury chloride in sea water. *Analytica Chimica Acta*, 98 (2): 389-392.

Svobodová, Z.; Dusek, L.; Hejtmánek, M.; Vykusová, B.; Smíd, R. 1999. Bioaccumulation of mercury in various fish species from Orlík and Kamýr reservoirs in the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 231-240.

Tremblay, A.; Lucotte, M.; Schetagne, R. 1998. Total mercury and methylmercury accumulation in zooplankton of hydroelectric reservoirs in northern Québec (Canada). *Science of the Total Environment*, 213: 307-315.

Tseng, C.M.; Balcom, P.H.; Lamborg, C.H.; Fitzgerald, W.F. 2003. Dissolved elemental mercury investigations in long island sound using on-line Au amalgamation-Flow injection analysis. *Environmental Science and Technology*, 37 (6): 1183-1188.

Tundisi, J.G.; Forsberg, B.R.; Devol, A.H.; Zaret, T.M.; Tundisi, T.M.; Santos, A.; Ribeiro, J.S.; Hardy, E.R. 1984. Mixing patterns in Amazon lakes. *Hydrobiologia*, 108: 3-15.

Tundisi, J.G.; Bicudo, C.E.; Matsumura-Tundisi, T. 1995. *Limnology in Brazil*. Academia Brasileira de Ciências e Sociedade Brasileira de Limnologia, Rio de Janeiro, 376p.

Tuomola, L.; Niklasson, T.; Silva, E.C.; Hylander, L.D. 2008. Fish mercury development in relation to abiotic characteristics and carbon sources in a six-year-old, Brazilian reservoir. *Science of the Total Environment*, 390: 177-187.

Ulrich, S.M.; Tanton, T.W.; Abdrashitova, S.A. 2001. Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31: 241-293.

Vandal, G.M.; Mason, R.P.; Fitzgerald, W.F. 1991. Cycling of volatile mercury in temperate lakes. *Water Air and Soil Pollution*, 56: 791-803.

Verdon, R.; Brouard, D.; Demers, C.; Lalumiere, R. 1991. Mercury evolution (1978-1988) in fishes of the La Grande Hydroelectric Complex, Quebec, Canada. *Water, Air and Soil Pollution*, 56: 405-417.

Wang, Q.; Feng, X.; Yang, Y.; Yan, H. 2011. Spatial and temporal variations of total and methylmercury concentrations in plankton from a mercury-contaminated and eutrophic reservoir in Guizhou Province, China. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30: 2739-2747.

Watras, C.J.; Morrison, K.A.; Back, R.C. 1996. Mass balance studies of Hg and methylHg in small temperate boreal lakes of the northern hemisphere. In: Baeyerns, W.; Ebinghaus, R.; Vasiliev, O. (Ed.). *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, New Holland, p.329-358.

Watras, C.J.; Back, R.C.; Halvorsen, S.; Hudson, R.J.M.; Morrison, K.A.; Wentw, S.P. 1998. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *The Science of the Total Environment*, 219: 183-208.

WHO (World Health Organization). 1991. *Inorganic Mercury*. Environmental Health Criteria, Gênova, 153p.

Windom, H.L.; Byrd, J.T.; Smith, R.G.; Huan, F. 1991. Inadequacy of NASQAN data for assessing metal trends in the Nations's rivers. *Environmental Science and Technology*, 25: 1137-1142.

Winfrey, M.R.; Rudd, J.W.M. 1990. Environmental factors affecting the formation of methylmercury in low pH lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9: 853-869.

Yu, L.-P.; Yan, X.-P. 2003. Factors affecting the stability of inorganic and methylmercury during sample storage. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (4): 245-253.

APÊNDICE A – Artigo publicado na Revista *Environmental Science & Technology*

APÊNDICE B – Ficha de avaliação de cada membro da banca do trabalho de conclusão escrito

APÊNDICE C – Ata da aula de qualificação e ata da defesa oral

Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil

Daniele Kasper,^{*,†} Bruce R. Forsberg,[†] João H. F. Amaral,[†] Rafael P. Leitão,[†] Sarah S. Py-Daniel,[†] Wanderley R. Bastos,[‡] and Olaf Malm[§]

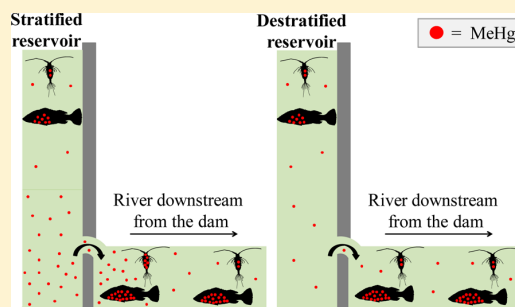
[†]Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brazil

[‡]Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

[§]Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: The river downstream from a dam can be more contaminated by mercury than the reservoir itself. However, it is not clear how far the contamination occurs downstream. We investigated the seasonal variation of methylmercury levels in the Balbina reservoir and how they correlated with the levels encountered downstream from the dam. Water, plankton, and fishes were collected upstream and at sites between 0.5 and 250 km downstream from the dam during four expeditions in 2011 and 2012. Variations in thermal stratification of the reservoir influenced the methylmercury levels in the reservoir and in the river downstream. Uniform depth distributions of methylmercury and oxygen encountered in the poorly stratified reservoir during the rainy season collections coincided with uniformly low methylmercury levels along the river downstream from the dam. During dry season collections, the reservoir was strongly stratified, and anoxic hypolimnetic water with high methylmercury levels was exported downstream. Methylmercury levels declined gradually to 200 km downstream. In general, the methylmercury levels in plankton and fishes downstream from the dam were higher than those upstream. Higher methylmercury levels observed 200–250 km downstream from the dam during flooding season campaigns may reflect the greater inflow from tributaries and flooding of natural wetlands that occurred at this time.



INTRODUCTION

The impoundment of rivers for hydroelectric power generation can cause a series of impacts, including local extinction of species, increased greenhouse gases emissions, eutrophication, and increased mercury concentrations in aquatic biota.^{1–3} These changes occur due to the conversion of terrestrial ecosystems and a flowing river into a large reservoir lake that can become stratified seasonally, where large amounts of organic matter, nutrients, and trace elements are released from decaying terrestrial vegetation and soils to the water column. The anoxic environments produced under these conditions are especially favorable for the methylation and bioaccumulation of mercury in the reservoir food chain.^{2,4} Recent studies have shown that river impoundment can often have greater effects on the downstream river ecosystem than on the reservoir itself. With regards to mercury, the levels encountered in surface waters⁴ and fish^{5,6} have generally been found to be higher downstream from reservoir dams than upstream.

The high amounts of methylmercury (MeHg) downstream from dams can be attributed to reservoir stratification that increases anoxia in hypolimnetic waters and favors mercury methylation and MeHg bioaccumulation.^{2,4} The release of

hypolimnetic waters through turbines below dams increases MeHg availability downstream⁴ and promotes its bioaccumulation and biomagnification through the aquatic food web.⁵ Studies have shown that this dynamic can vary seasonally with the stratification–destratification pattern of the reservoir with high MeHg in the reservoir hypolimnion and downstream river waters during stratification periods and decreased methylmercury levels in hypolimnetic and downstream river waters during destratification periods.^{4,7} Fish (*Curimata cyprinoides*) living downstream from the Petit-Saut Reservoir (Amazon region), which fed on organic matter and microorganisms derived from the reservoir's anoxic hypolimnion, were found to have 10-fold higher mercury levels than those living in the reservoir, showing a clear link between MeHg export and downstream contamination.⁸ Fish located downstream from the dams can also have higher mercury levels due to changes in feeding habit.^{2,6} Omnivorous fish downstream from the Tucuruí

Received: September 24, 2013

Revised: December 26, 2013

Accepted: January 3, 2014

Published: January 3, 2014

Reservoir (Brazilian Amazon) had higher mercury concentrations and trophic levels than those upstream from the dam.⁶ In the Robert-Bourassa Reservoir (Canada), benthic feeding fish became piscivorous downstream from the dam, resulting in higher mercury levels.²

Most studies on mercury contamination downstream from reservoirs have focused on the regions immediately below the dams^{5,6,8,9} without considering the variation in mercury levels further downstream. Reservoir effects on mercury levels were observed in water collected 22 km downstream⁴ and in fish located up to 275 km downstream from the Robert-Bourassa Reservoir² and over 300 km downstream from the Smallwood Reservoir.¹⁰ In a less than 1 year old Chinese reservoir, there was no clear pattern of total mercury levels in water and plankton in the river around 100 km downstream from the dam.¹¹ The geomorphological and limnological characteristics of a river are important to consider when evaluating the impacts of hydroelectric dams because the river interacts with the water released from the reservoir. Schetagne and Verdon² suggest that the distance downstream from a dam at which fish mercury levels increase depends on the extent of dilution from tributaries along the reach and the presence of large bodies of water (lakes or reservoirs) permitting the sedimentation of mercury-rich material. However, high mercury levels persisted in fish far below the Smallwood Reservoir dam even after the river passed through two large lakes.¹⁰ This author suggests that habitat use and prey preferences of fish can also influence on the extent of the dam effect on mercury levels. In fact, studies in the Samuel⁵ and Lago Manso¹² reservoirs suggest that fishes feeding on allochthonous food show little or no effect of the dam on their mercury levels because most of their food is not derived from the contaminated river system. The inflow of tributaries downstream from the Petit-Saut reservoir contributed reactive mercury that was methylated in the Sinnamary River, resulting in greater MeHg transport downstream from the dam.¹³ Fluvial wetlands, naturally present in the Amazonian basin, can also be important sites for methylation,¹⁴ contributing significant amounts of MeHg to the river system. Thus, many physical, chemical, and biological factors must be considered when assessing the downstream impacts of dams. The scarcity of data on the mercury levels in river waters and biota, especially plankton, far below reservoirs has limited our understanding of the dam effect. We present here the results of an investigation of the variation in methylmercury contamination along a 250 km reach of the Uatumã River downstream from Balbina, a tropical hydroelectric reservoir in the central Brazilian Amazon.

The specific objectives of the study were (i) to investigate the influence of seasonal variation in thermal stratification above the dam on the levels of methylmercury in the reservoir and in the river downstream and (ii) to investigate the influence of the reservoir on methylmercury levels in surface water, plankton, and fish along the extended downstream study reach. This is the first study that simultaneously considers the combined effect of a reservoir on all of these components.

MATERIALS AND METHODS

Study Area. The Balbina Reservoir (01° 52' S; 59° 30' W) was formed in 1987 by damming the Uatumã River in the central Amazon basin. The climate in the region is tropical humid, with annual rainfall of 2000 mm concentrated between December and May. The precipitation along the sampling year is showed in Figure S1 of the Supporting Information. The

average flooded area of the reservoir lake is 2400 km², and the hydraulic residence time is about 14 months.¹⁵ The water level of the reservoir lake is controlled to maximize the power generation and varied from 21 to 24 m (depth immediately upstream from the dam) during the study period. Previous studies monitoring the reservoir monthly (1989–1999)¹⁶ and bimonthly (2004–2005)³ showed that the reservoir is thermally stratified most of the year resulting in the development of anoxia in bottom waters, except in March–May when there is a more oxygenated homogeneous water column due to weakened thermal stratification during the rainy season. The water removed for power generation is drawn through a grating that begins at an average depth of 14 m and extends to the bottom,³ entirely below the oxycline in most cases, which means that the characteristics of downstream waters are strongly influenced by seasonal stratification dynamics in the reservoir. All water used for power generation leaves through the turbines, even during the rainy season, and the spillways are opened only rarely during unusual rains. Immediately downstream from the dam, the Uatumã River passes through a narrow valley in the Guyana Shield. It has a narrow floodplain in this region (0–400 m) and no significant interfluvial wetland in its drainage, with water levels varying rapidly within narrow limits in response to reservoir management¹⁷ (depth: 6 ± 2 m). In contrast, the lower stretch of the river flows through the central Amazon sedimentary basin, characterized by flat topography with extensive alluvial floodplains. The floodplain of the Uatumã is much broader in this reach (1–6 km) and is inundated by a strong seasonal flood pulse (depth: 1–9 m), with high water levels occurring from April to June (Figure S1, Supporting Information). The flood dynamic in this region is a backwater effect linked to the annual flood pulse of the Amazon River main channel.

The reservoir is surrounded mainly by natural broadleaf tropical forest areas with some small communities and the village of Balbina. The left margin of the reservoir is occupied by the ReBio do Uatumã Reserve that encompasses 9387 km² of the drainage basin. There is no gold mining in the Uatumã basin.

Sampling and Laboratory Analyses. Samples were collected during four expeditions (Figure S1, Supporting Information) to account for the major variations in the water chemical characteristics that are linked to the seasonal rainfall pattern.^{3,16} Campaigns took place from August 30 to September 10, 2011 (dry season), from December 17 to 21, 2011 (early wet season), from March 31 to April 4, 2012 (wet season), and from June 27 to July 2, 2012 (early dry season), designated as August 2011, December 2011, March 2012, and June 2012, respectively. In the lower stretch of the Uatumã, these campaigns reflected the two flood phases (high and low water).

Water samples for MeHg analyses were collected on the four expeditions and limnological measurements (pH, dissolved oxygen, electric conductivity, and temperature) were made at the same times and sites. We sampled water along a vertical profile immediately upstream from the dam at approximately 3 m depth intervals using a Van Dorn bottle. Downstream from the dam, subsurface water (0.3 m depth) was collected in the center of the Uatumã channel at a point equidistant from the riversides. The samples were taken at six locations along the river between 0.5 and 250 km downstream from the dam (hydrological distance). Using ultraclean techniques,¹⁸ we collected 250–500 mL water samples in amber glass bottles

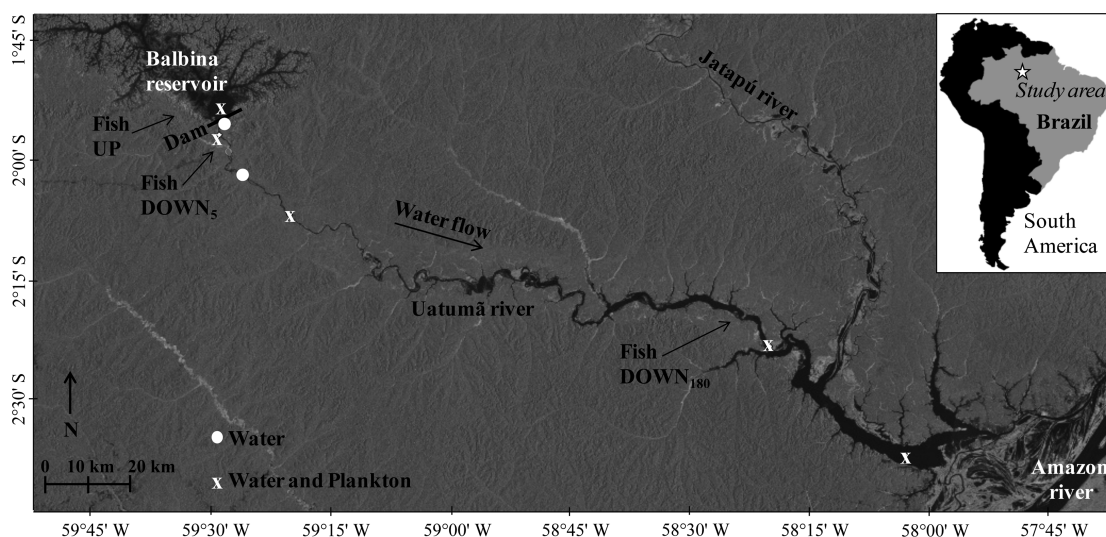


Figure 1. Sampling sites on the Balbina Reservoir and the Uatumã River, downstream from the dam. Background image is L band SAR acquired by the JERS-1 satellite in 1995 (Nasda/MITI). Fish UP, DOWN₅, and DOWN₁₈₀ correspond, respectively, to the sampling sites for fish in the reservoir and in the Uatumã River, 5 and 180 km downstream from the dam.

with Teflon lids. The sample bottles were cleaned according to EPA 1630,¹⁹ briefly, the bottles were filled with sequential solutions of ultra pure water with HCl and heated for several hours. Between each cleaning step, the bottles were rinsed three times with ultra pure water. Finally, the bottles were double bagged in polyethylene zip-type bags. Bottle and field blanks were used to evaluate contamination.¹⁹ The samples were preserved by adding HCl a few hours after collection and storing them in a cool dark environment.¹⁹ Field duplicates were collected to assess the precision of the field sampling.¹⁹ MeHg analyses were conducted on unfiltered water following EPA method 1630,¹⁹ using 1% APDC solution on distillation, ethylation, and CVAFS (MERX, Brooks Rand). We analyzed each water sample in duplicate and checked the accuracy by analyses of matrix spikes of MeHg (spiked 2–30 h before analyses) with true concentration¹⁹ ranging between 0.02 and 0.55 ng L⁻¹ (recovery: 97 ± 12%; n = 43). The detection limit of MeHg was 0.012 ng L⁻¹, corresponding to the mean of concentrations of the method blanks plus three times the standard deviation of the blanks.²⁰ In an analytical intercalibration performed for MeHg analysis in water, our laboratory's performance was considered satisfactory.²¹

We collected plankton at the same time water samples were taken, except during the first campaign when the plankton was not collected. We sampled plankton at three sites near the dam in the reservoir lake and at 5, 35, 200, and 250 km downstream from the dam (Figure 1). At each site, conical plankton nets of 70 and 350 μm mesh size were hauled horizontally just below the water surface. Both nets collected mainly zooplankton due to the large mesh; however, some net algae could be included in those filtered materials. In order to obtain a more pure zooplankton sample, the filtered material was separated into phytoplankton and zooplankton according to the methodology described in Palermo.²² Briefly, immediately after collection, we transferred each sample to a decantation funnel and added around 500 mL of carbonated mineral water. After 30 min, the zooplankton become narcotized, sank to the bottom of the funnel, and was decanted, while the phytoplankton remained

suspended allowing the sequential collection of both materials. As expected, suspended material (phytoplankton) was scarce because these mesh nets collect mainly zooplankton, not holding much of phytoplankton because it is generally smaller. Therefore, phytoplankton was disregarded, and we determined methylmercury levels only in zooplankton. These separations are not always perfect because it is a rough separation method, in which the plankton is not separated cell by cell, and some algae were probably included in the zooplankton samples. However, Palermo²² considered this method adequate for plankton separation. Phytoplankton remains could decrease the MeHg levels observed in the zooplankton samples because phytoplankton generally has lower MeHg than zooplankton.

Zooplankton samples were stored at -18 °C, freeze-dried, and analyzed for MeHg content according Almeida,²³ using 25% KOH/methanol solution, ethylation and CVAFS (MERX, Brooks Rand). We analyzed each sample in duplicate whenever possible (some samples had low mass). The recoveries of certified reference samples were 81 ± 5% (IAEA-142; n = 6), 80 ± 2% (DORM-3; n = 4), 97 ± 3% (IAEA-140; n = 2), and 83 ± 4% (IAEA-405; n = 3). The minimum detectable concentration was 0.29 μg kg⁻¹.

Piscivorous fish (*Cichla* spp.) were captured in the reservoir (UP; n = 37) and in the Uatumã River, 5 km (DOWN₅; n = 21) and 180 km downstream from the dam (DOWN₁₈₀; n = 36), between September and December 2011 (Figure 1). Were selected only adult individuals based on the length of first gonadal maturation.^{24,25} Hg levels in fish, particularly in muscle, are integrated over longer time periods than plankton. Therefore, the results for fish are considered to be representative of the entire sampling period. We determined total mercury levels (THg) on fresh skinless dorsal muscle (located above the lateral line) by hot acid extraction and CVAAS-FIMS (FIMS 400, Perkin-Elmer) following Bastos et al.²⁶ We analyzed samples in duplicate and in parallel with certified material (DORM-3 recovery: 99 ± 5%; n = 3) as well as standard samples produced in the laboratory and used in intercalibration exercises among Brazilian laboratories (AFPX-

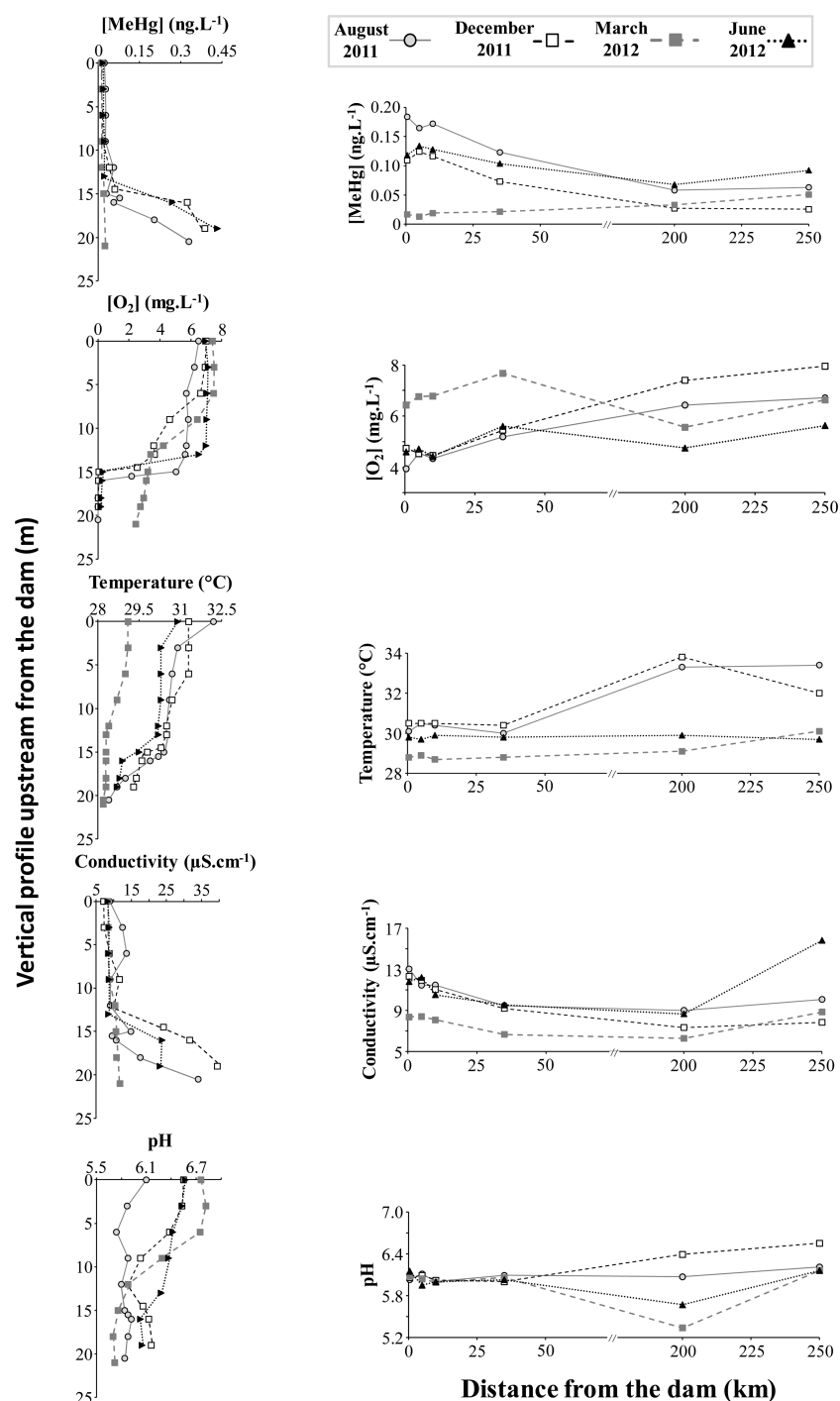


Figure 2. Seasonal variation in the vertical profiles of water quality parameters upstream from the Balbina Dam (left) and in subsurface waters between 0.5 and 250 km downstream from the dam (right).

5130 recovery: $109 \pm 3\%$; $n = 5$). The minimum detectable concentration was $4 \mu\text{g kg}^{-1}$. Kehrig et al.²⁷ analyzed methylmercury levels in muscle of *Cichla* spp. from the Balbina Reservoir and found that on average $96 \pm 4\%$ of the total mercury was methylmercury. Therefore, in the following results

and discussion, we consider that almost all THg content in fish was MeHg.

The mercury concentrations presented here for water, plankton, and fish samples represent the direct analytical results uncorrected for the observed recoveries of the spikes and certified reference materials.

RESULTS

Methylmercury in Water and Limnological Conditions.

The reservoir was stratified throughout the sampling campaigns, except in March 2012, with anoxic conditions prevailing at depths below 15 m (Figure 2). The level of vertical stratification was evaluated during each sampling campaign by monitoring profiles of temperature and oxygen during at least 48 h at 2–10 h intervals (data not shown). The MeHg levels in anoxic hypolimnetic waters (0.33 ng L^{-1} , on average) were higher than those near the surface ($<0.02 \text{ ng L}^{-1}$). When the water column was well stratified, the temperature decreased with depth and electrical conductivity increased (subsurface bottom waters: 31.5 ± 0.7 – $28.8 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$; 8.2 ± 0.3 – $32.2 \pm 8.3 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$). Methylmercury levels decreased along the river downstream from the dam in August and December 2011, which is the low water period in the lower reach of the Uatumã (August: 0.18 – 0.06 ; December: 0.11 – 0.03 ng L^{-1} ; 0.5 – 250 km downstream). In July 2011, the high-water season, MeHg levels decreased from 0.5 to 200 km downstream (0.12 to 0.06 ng L^{-1} , respectively), but then increased at 250 km downstream (to 0.09 ng L^{-1}). Uniform depth distributions of MeHg ($0.02 \pm 0.01 \text{ ng L}^{-1}$) and conductivity ($9.8 \pm 1.3 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$) were only encountered in the reservoir during March 2012 when oxygen and temperature showed little variation with depth (subsurface bottom waters: 7.4 – 2.5 mg L^{-1} ; 29.1 – $28.2 \text{ }^\circ\text{C}$), indicating a poorly stratified water column. In this period, MeHg concentrations were uniformly low along the river downstream from the dam ($0.02 \pm 0.01 \text{ ng L}^{-1}$), increasing only slightly between 200 and 250 km downstream from the dam (0.05 ng L^{-1}) where the floodplain of the Uatumã was inundated due to high-water conditions. During all sampling periods, oxygen levels increased in the first 35 km downstream from the dam (0.5 – 35 km : 4.9 ± 1.1 – $6.0 \pm 1.1 \text{ mg L}^{-1}$).

Methylmercury Levels in Plankton. The methylmercury levels within each size-fraction of zooplankton from the Balbina Reservoir were similar regardless of the sampling site or period (8 ± 3 and $12 \pm 4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$, respectively, for 70 and $350 \text{ } \mu\text{m}$ fractions; Figure 3). Downstream from the dam, the levels in

March 2012 (5 – $29 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$) were in general lower than those in the other two sampling periods (9 – $63 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$). In March 2012, the zooplankton from the upstream site had MeHg levels ($8 \pm 2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$) similar to zooplankton in the first 35 km downstream from the dam ($9 \pm 2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$), with an increase in levels in the flooded lower stretch of the Uatumã, reaching $26 \pm 4 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$ at 250 km downstream. In the other two sampling periods (December 2011 and June 2012), zooplankton showed an increase in MeHg levels just below the dam. In December 2011, MeHg values were highest 35 km downstream ($34 \pm 6 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$) and then decreased along the lower Uatumã, which was in the dry phase of its flood cycle reaching $11 \pm 3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$ at 250 km downstream similar to upstream values ($13 \pm 3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$). In June 2012, MeHg levels increased along the Uatumã River reaching $63 \pm 1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ d.w.}$, the highest values observed, at 250 km downstream, which was in peak flood stage (Figure 3).

Total Mercury Levels in Piscivorous Fish. The average total mercury levels in fish muscle in the reservoir, 5 and 180 km downstream from the dam, were 383 ± 143 , 663 ± 147 , and $733 \pm 354 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ wet weight, respectively. Weight and standard length of fish were positively correlated (Pearson's test: UP: $r^2 = 0.95$, $p < 0.0001$; DOWN₅: $r^2 = 0.89$, $p < 0.0001$; DOWN₁₈₀: $r^2 = 0.92$, $p < 0.0001$); therefore, in the following results, and discussion on fish size refers to standard length rather than weight. Mercury levels in fish varied significantly between sites, with standard length and with the interaction between these factors (ANCOVA: interaction: $F = 7.311$, $p = 0.008$; length: $F = 5.762$, $p = 0.018$; site: $F = 21.562$, $p < 0.0001$; Figure 4a). In order to better compare differences between sampling sites, we narrowed the standard length of fish considered to 24 – 31 cm , which resulted in a slight reduction in sample size (UP: $n = 31$; DOWN₅: $n = 9$; DOWN₁₈₀: $n = 13$). In general, the fish captured UP were smaller than DOWN (Figure 4a), with 24 cm being the smallest fish captured DOWN and 31 cm the biggest captured UP. The selected fish had no statistical difference in standard length between sites (ANOVA: $F = 2.272$, $p = 0.114$), and those from upstream showed lower Hg levels than those from 5 and 180 km downstream (ANOVA: $F = 24.741$, $p < 0.0001$; Figure 4b).

Considering all specimens analyzed, 24% , 86% , and 97% of them at UP, DOWN₅, and DOWN₁₈₀ sites, respectively, exceeded the maximum recommended limit for human consumption ($0.5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ wet weight) established by the World Health Organization.²⁸

DISCUSSION

The MeHg levels in the Balbina Reservoir and in the first 35 km downstream from the dam were strongly influenced by variations in thermal stratification of the reservoir among the different sampling campaigns. During the dry season sampling campaigns, the high MeHg concentrations in water exported from the hypolimnion of the reservoir to the river declined gradually until 200 km downstream from the dam. The higher methylmercury levels in plankton and fish downstream suggested that MeHg exported from the dam was accumulated by downstream biota. During the wet season sampling campaign, no evidence of vertical stratification was observed in the reservoir, and in general, the MeHg concentrations in the reservoir and in the river downstream were lowest. The seasonal inundation of alluvial wetlands and the larger discharge of tributaries may have contributed to the higher MeHg

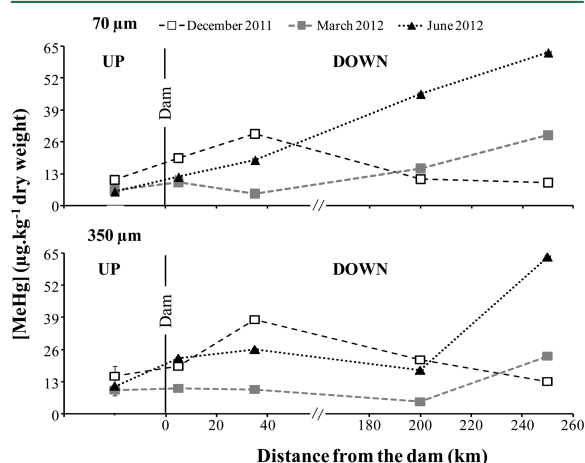


Figure 3. Seasonal and longitudinal variation in methylmercury levels in zooplankton collected with 70 and $350 \text{ } \mu\text{m}$ mesh nets, refined according to Palermo,²² upstream and downstream from Balbina Dam. Upstream value means and vertical bars when bigger than the symbols represent the standard deviation for triplicate samples.

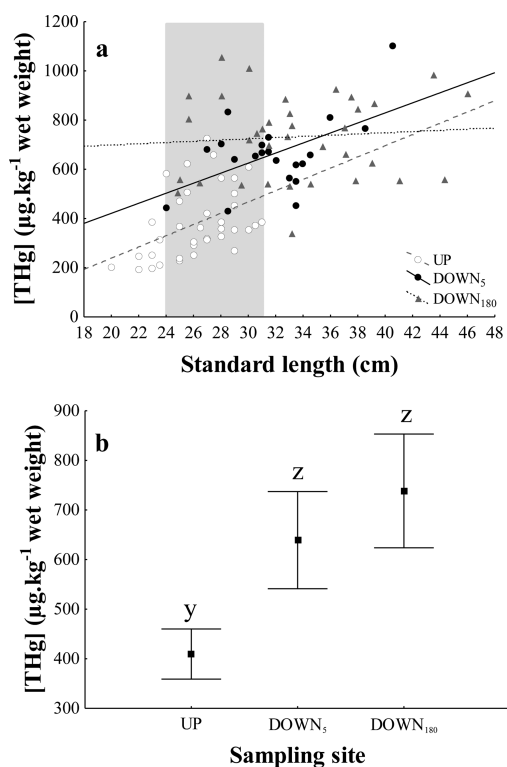


Figure 4. Total mercury levels in fish muscle (*Cichla* spp.) in relation to (a) fish standard length and (b) collection location. Locations include upstream from dam (UP) and 5 and 180 km downstream from Balbina Dam (DOWN₅ and DOWN₁₈₀, respectively). Gray area represents selected fish based on its standard length (see text for details). These selected specimens are represented in (b), where black squares are the mean of THg levels, bars indicate 95% confidence intervals, and sampling sites that differ from each other at the significance level of 0.05 are presented with different letters (UP < DOWN₅ = DOWN₁₈₀).

concentrations observed in the lower stretch of Uatumã during high-water sampling campaigns.

A hypolimnion with low oxygen levels and rich in MeHg was also observed in two other Amazon reservoirs, Samuel²³ and Petit-Saut,^{7,9} suggesting that methylation commonly occurs under these conditions.⁹ Samuel and Balbina are both of similar age and have no gold mining in their basins. Balbina has a 10-fold higher surface area than Samuel and longer hydraulic residence time, 14 compared to 3.5 months. These conditions could explain the higher MeHg levels in the hypolimnion of Balbina when compared with those from Samuel (0.15 ± 0.10 ng L⁻¹).²³ Petit-Saut has a smaller surface area than Balbina; however, the former is deeper, younger (impounded in 1995), and develops a more anoxic hypolimnion with higher MeHg levels (reaches up to 1.1 ng L⁻¹)⁷ than Balbina. At our sampling site in the Balbina Reservoir, MeHg levels varied with the degree of thermal stratification, with the lowest MeHg levels encountered during the wet season sampling campaign when no evidence of thermal stratification was observed. In the Petit-Saut Reservoir and Elephant-Butte Reservoir (U.S.A.), consistent changes in MeHg levels in water were also associated with stratification–destratification dynamics.^{4,7} Besides their influence on the reservoir per se, hypolimnetic processes thus

appear to have a strong affect on the biogeochemistry in the river downstream, especially in the reach near the dam. We observed higher MeHg levels in river water and plankton just below the dam compared with those near the reservoir surface only in sampling campaigns where the reservoir was thermally stratified. At the Petit-Saut Dam, mercury outputs from the reservoir were also 25% higher during the dry seasons than in the season when the water column was well mixed.⁷

The extent to which mercury levels remain high downstream from a dam may depend on the presence of large deep lakes that may trap MeHg-rich particles, as well as on the amount of dilution from tributaries below the reservoir.² Particle deposition is unlikely to have affected MeHg levels in the Uatumã River, especially in the first 35 km downstream because this reach has no lakes or other lentic habitats and has frequent rapids and cascades that generate turbulence that maintains particles in suspension. Because there are some small streams flowing into this stretch, dilution may also have contributed to the observed decrease in the MeHg levels in river water. Discharge measured for 20 years (between 1977 and 1996) was on average 607 ± 349 m³ s⁻¹ at 35 km downstream, a water load 9% greater than at 5 km downstream from the dam.²⁹ In contrast, the drop in MeHg levels in water observed over the same reach during the sampling campaigns of August 2011, December 2011, and June 2012 was much larger, 25%, 42%, and 23%, respectively. Therefore, we believe that other processes (besides the dilution) not evaluated in the present study may have contributed to the observed decrease in MeHg levels. Demethylation and the adsorption of MeHg on biofilms and on the geological substratum embanking the Uatumã may have all contributed to this decline. Moreover, during sampling campaigns when the reservoir was stratified, large particulates (flocks), presumably iron oxide precipitates, were regularly encountered, and the MeHg levels in these particulates decreased in the first 35 km below the dam (unpublished data) due apparently to an additional unidentified loss process.

Between 35 and 250 km downstream, dilution becomes more important due to the added discharge of larger tributaries, resulting in an average discharge of 2262 m³ s⁻¹ at 250 km downstream (unpublished data). Contrary to the trend expected by dilution, MeHg levels in water and plankton increased at 250 km in March and June 2012 (high-water period in this reach). During these two sampling campaigns, the lower reach of Uatumã River had lower oxygen and pH levels than those observed in August and December 2011 (low-water period). The higher discharge of tributaries in the lower reach in this period could have resulted in those limnological changes. Downstream from the Petit-Saut Reservoir, the inflow of tributaries resulted in the dilution of MeHg level, but also created favorable conditions for local mercury methylation, and consequently, downstream there are localized regions of dilution and production of MeHg.¹³ A similar effect could occur in the lower reach of the Uatumã River during the high-water season with the enhancement of particulate mercury mobility and sulfate-reducing bacterial activity due to changes in limnological conditions. On the other hand, those limnological conditions could be a consequence of seasonal changes linked to the river flood pulse. During flooding, large inputs of allochthonous and autochthonous organic matter to alluvial wetlands result in anoxic and acidic conditions especially conducive to mercury methylation.³⁰ Assays of mercury methylation in the Tapajós River identified the flooded forests and macrophyte mats that are widely available

during the high-water season as important compartments to the MeHg production.¹⁴ The flood pulse inundates 6300 km² of alluvial floodplain along the Uatumã River, mostly in the lower reaches during high-water season,³¹ and is a natural backwater effect linked to the flood dynamics of Amazon River main channel, occurring independently of the discharge pattern of Balbina Dam. Regardless of whether the unique limnological conditions in the lower Uatumã are due to increased tributary inputs of the seasonal flood pulse or a combination of both, they are both natural processes that could have contributed to a local increase in Hg methylation and concentrations in this region. Therefore, particularly during high-water sampling campaigns in the lower stretch of Uatumã, local methylation probably had a greater influence on MeHg levels than export from the Balbina Reservoir. In fact, during sampling campaigns at low-water season, MeHg levels declined 250 km downstream. In summary, we conclude that MeHg dynamics in water and plankton of the Uatumã River near the dam is driven by the seasonal stratification of reservoir, while MeHg dynamics in the lower Uatumã is controlled by the seasonal flood pulse and/or tributary inputs. The suite of processes underlying these downstream changes is still unclear, and the scarcity of studies investigating biogeochemical processes over extended reaches below dams limits the discussion of more generalized patterns.

The plankton samples showed an increase in MeHg levels in the first 35 km downstream from the dam in the sampling campaigns in which the reservoir was stratified, evidence that the MeHg exported by the dam is taken up by plankton and, consequently, could be transferred to local biota. Methylmercury has a high assimilation efficiency and low elimination rate by aquatic organisms.³² Zooplankton were estimated to take up 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight per km between 5 and 35 km downstream of the dam. The influence of this uptake on dissolved MeHg concentrations could not be determined because zooplankton biomass was not estimated. However, the elevated rates of uptake indicated a high potential for MeHg transfer to higher trophic levels. An increase of about three times was also encountered in the mercury levels of plankton just below Tucuruí, a permanently stratified reservoir in the eastern Amazon.³³ The lower levels of MeHg encountered in plankton just below the dam when the reservoir was unstratified in March 2012 indicated a strong link between stratification patterns, MeHg export, and plankton contamination in this reach of the river. In contrast, the higher concentrations of MeHg encountered in plankton in the lower Uatumã during high-water samplings when compared with low-water samplings indicated the dominant influence of the season flood cycle on this pattern. The MeHg levels observed in zooplankton of the Balbina Reservoir are similar to those reported for zooplankton in four Brazilian reservoirs (Tucuruí, Santana, Vigário, and Lajes reservoirs)²² and an artificial lake³⁴ in the United States. However, they are lower than those encountered in other reservoirs located in Brazil,²³ the United States,^{34,35} China,³⁶ and Canada^{37,38} (up to 840 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight). Some of these reservoirs with higher concentrations were contaminated by Hg from mining activities or are younger than Balbina. The levels of MeHg in the Uatumã River downstream from the Balbina Dam were similar or slightly lower than those encountered in the rivers downstream from the Samuel Dam²³ and Tucuruí Dam,²² both Amazonian reservoirs. In the present study, we did not evaluate the community structure and abundance in plankton samples, and this may have biased our interpretation of their MeHg levels.

Higher mercury levels in fish immediately downstream from dams have also been reported for other Amazonian^{5,8,33} and temperate reservoirs.^{2,10} This pattern has been associated with the stratification of the reservoir lake and downstream discharge of MeHg-rich hypolimnetic waters⁵ or with differences in the feeding habits and trophic levels of fish above and below the dam.⁶ In the present study, we observed an increase of MeHg availability downstream from the dam due to hypolimnetic exportation, which apparently leads to a higher bioaccumulation of mercury by fish located immediately downstream. Because we studied piscivorous fish, differences in the mercury levels in prey species may have also contributed to this downstream trend. However, studies of the diet of *Cichla* spp. in the Balbina Reservoir^{39,40} and several Amazonian rivers including the Uatumã River^{41–44} indicate that its feeding habits and trophic level are similar. Thus, we conclude that the higher Hg levels in fish from the Uatumã River immediately downstream from Balbina Reservoir are mainly due mercury export from the dam (“dam effect”). Studies in temperate reservoirs have revealed increases of mercury levels in fish caught from 275 to over 300 km downstream.^{10,2} We found that fish had similar mercury levels at 5 and 180 km downstream from the Balbina Dam. We suggest that at DOWN₅ MeHg reaches fish mainly by hypolimnetic exportation through the dam and at DOWN₁₈₀ by the combined influence of reservoir export and methylation in the lower reach of the Uatumã. At the DOWN₁₈₀ site, fish may still be receiving mercury from the Balbina Reservoir because MeHg concentrations in water and plankton decrease between 35 and 200 km downstream; the reservoir-derived MeHg can be still present at 180 km downstream. These fish may also be assimilating locally produced MeHg derived from tributaries inflows and/or natural wetlands. The variable mixture of MeHg from these sources (anthropogenic and natural) may have resulted in the high Hg levels encountered in fish from DOWN₁₈₀.

The genus *Cichla* is an important sport fish⁴⁵ and also an important protein source for populations living around the Balbina Reservoir.²⁷ The consumption of *Cichla* ranges from one to seven times a week, with an average daily consumption per capita of 110 g for adults.²⁷ Considering this consumption and the mean of THg observed in fish from Balbina reservoir, daily MeHg intake was estimated to range from 6 to 44 μg for inhabitants of reservoir. Most of the analyzed fish exceeded the mercury level recommended by World Health Organization for safe consumption,²⁸ especially those from downstream sites.

Mercury concentrations found in *Cichla* spp. in the Balbina Reservoir were of the same order of magnitude as those reported in earlier studies with this genus of fish from three Amazonian reservoirs (Samuel,⁵ Balbina,²⁷ and Tucuruí³³) and lower than those encountered in an Amazonian artificial lake impacted by gold mining.⁴⁶ The Hg levels in fish from downstream sampling sites were of the same magnitude as those reported for *Cichla* spp. downstream from the Tucuruí Dam³³ and Samuel Dam.⁴⁷ Considering all piscivores, the concentrations observed in *Cichla* from Balbina were similar to those reported piscivores in several tropical,²² subtropical,¹¹ and Canadian^{10,48,49} reservoirs but higher than those observed in the Brazilian reservoir of Lago Manso,¹² the Petit-Saut Reservoir,⁵⁰ an artificial Amazonian lake,⁴⁶ and some Canadian reservoirs⁴⁹ that in general are younger than Balbina and/or have mercury contamination in their basin.

Studies of Hg dynamics should not be restricted to the areas immediately surrounding a reservoir. Basin-scale studies are needed to evaluate the combined effects of impoundment and natural processes both above and below the dam on mercury dynamics and human health risks.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Precipitation at Balbina reservoir and water level of the Amazon river near the Uatumã's mouth are detailed. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone/Fax: +55 92 3643 1904. E-mail: kasperdani@yahoo.com.br. Address: Laboratório de Ecossistemas Aquáticos, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. Ephigênio Salles, 2239, Manaus, AM, 69060-020, Brazil.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors are thankful for the financial support of CNPq, FAPAM, and CAPES and for the logistical support of INPA, Amazonas Energia, ICM-BIO/Rebio Uatumã, and SEPROR. We also thank J. Rocha, A. Santos, and B. Lima for assistance with fieldwork; C. Freitas, J. Zuanon, E. Ferreira, and E. Dary for assistance with fish collection and identification; C. Horie and I. Idelfonso for precipitation data; and the staff of Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (UNIR) and Laboratório de Radioisótopos (UFRJ) for their help with mercury analyses.

■ REFERENCES

- (1) Paiva, M. P. Impacto das grandes represas sobre o meio ambiente. *Cienc. Cult.* **1983**, *35* (9), 1274–1282.
- (2) Schetagne, R.; Verdon, R. Post-Impoundment Evolution of Fish Mercury Levels at the La Grande Complex, Québec, Canada (from 1978 to 1996). In *Mercury in the Biogeochemical Cycle*; Lucotte, M., Schetagne, R., Thérien, N., Langlois, C., Tremblay, A., Eds.; Springer: Berlin, 1999; pp 334.
- (3) Kemenes, A.; Forsberg, B. R.; Melack, J. M. Methane release below a tropical hydroelectric dam. *Geophys. Res. Lett.* **2007**, *34*, GL 029479.
- (4) Canavan, C. M.; Caldwell, C. A.; Bloom, N. S. Discharge of methylmercury enriched hypolimnetic water from a stratified reservoir. *Sci. Total Environ.* **2000**, *260*, 159–170.
- (5) Kasper, D.; Palermo, E. F. A.; Branco, C. W. C.; Malm, O. Evidence of elevated mercury levels in carnivorous and omnivorous fishes downstream from an Amazon reservoir. *Hydrobiologia* **2012**, *694*, 87–98.
- (6) Palermo, E. F. A.; Kasper, D.; Reis, T. S.; Nogueira, S.; Branco, C. W. C.; Malm, O. Mercury level increase in fish tissues downstream the Tucuruí Reservoir, Brazil. *RMZ – Mater. Geoenviron.* **2004**, *51*, 1292–1294.
- (7) Muresan, B.; Cossa, D.; Richard, S.; Dominique, Y. Monomethylmercury sources in a tropical artificial reservoir. *Appl. Geochem.* **2008**, *23*, 1101–1126.
- (8) Dominique, Y.; Maury-Brachet, R.; Muresan, B.; Vigouroux, R.; Richard, S.; Cossa, D.; Mariotti, A.; Boudou, A. Biofilm and mercury availability as key factors for mercury accumulation in fish (*Curimata cyprinoids*) from a disturbed Amazonian freshwater system. *Environ. Toxicol. Chem.* **2007**, *26*, 45–52.
- (9) Coquery, M.; Cossa, D.; Peretyazhko, T.; Azemard, S.; Charlet, L. Methylmercury formation in the anoxic waters of the Petit-Saut reservoir (French Guiana) and its spreading in the adjacent Sinnamary River. *J. Phys. IV France* **2003**, *107*, 327–331.
- (10) Anderson, M. R. Duration and extent of elevated mercury levels in downstream fish following reservoir creation. *River Syst.* **2011**, *19* (3), 167–176.
- (11) Li, S.; Zhou, L.; Wang, H.; Xiong, M.; Yang, Z.; Hu, J.; Liang, Y.; Chang, J. Short-term impact of reservoir impoundment on the patterns of mercury distribution in a subtropical aquatic ecosystem, Wujiang River, southwest China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2013**, *20*, 4396–4404.
- (12) Tuomola, L.; Niklasson, T.; Silva, E. C.; Hylander, L. D. Fish mercury development in relation to abiotic characteristics and carbon sources in a six-year-old, Brazilian reservoir. *Sci. Total Environ.* **2008**, *390*, 177–187.
- (13) Muresan, B.; Cossa, D.; Coquery, M.; Richard, S. Mercury sources and transformations in a man-perturbed tidal estuary: The Sinnamary Estuary, French Guiana. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2008**, *72*, 5416–5430.
- (14) Guimarães, J. R. D.; Roulet, M.; Lucotte, M.; Mergler, D. Mercury methylation along a lake-forest transect in the Tapajós river floodplain, Brazilian Amazon: seasonal and vertical variations. *Sci. Total Environ.* **2000**, *261*, 91–98.
- (15) Melack, J. M.; Wang, Y. Delineation of flooded area and flooded vegetation in Balbina reservoir (Amazonas, Brazil) with synthetic aperture radar. *Verh. - Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* **1998**, *26*, 2374–2377.
- (16) Figueiredo, M. D. M. A. M.; Laraque, A. Balbina, 10 anos depois; *Hydrological and Geochemical Processes in Large Scale River Basins*: Manaus, Brazil, 1999.
- (17) RADAM Brasil. *Folha SA - 20 Manaus: Geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra*; Levantamento de Recursos Naturais – 18; Ministério de Minas e Energia/Departamento Nacional da Produção Mineral: Rio de Janeiro, Brazil, 1978.
- (18) *Sampling Ambient Water for Trace Metals at EPA Water Quality Criteria Levels*; EPA Method 1669; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 1996.
- (19) *Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and CVAFS*; EPA Method 1630; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC, 2001.
- (20) Miller, J. C.; Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*; Ellis Horwood: Great Britain, 1994.
- (21) Creswell, J.; Engel, V.; Carter, A.; Davies, C. 2013 Brooks Rand Labs Interlaboratory Comparison Study for Total Mercury and Methylmercury (Intercomp 2013); Brooks Rand Labs: Seattle, 2013.
- (22) Palermo, E. F. A. Acúmulo e transporte de mercúrio em reservatórios tropicais. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2008.
- (23) Almeida, R. Estudo da origem, mobilização e organificação do mercúrio no reservatório da UHE de Samuel, RO. Ph.D. Dissertation, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, 2012.
- (24) Santos, R. N. Estratégias reprodutivas de peixes de um rio impactado por empreendimento hidrelétrico na Amazônia Central. Ph.D. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil, 2012.
- (25) Horie, C. A. C. Biologia reprodutiva e estrutura da população do tucunaré *Cichla vazzoleri* (Perciformes: Cichlidae) no reservatório da hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil, 2013.
- (26) Bastos, W. R.; Malm, O.; Pfeiffer, W. C.; Cleary, D. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. *Cienc. Cult.* **1998**, *50*, 255–260.
- (27) Kehrig, H. A.; Malm, O.; Akagi, H.; Guimarães, J. R. D.; Torres, J. P. M. Methylmercury in fish and hair samples from the Balbina reservoir, Brazilian Amazon. *Environ. Res.* **1998**, *77*, 84–90.
- (28) *Codex Alimentarius: Guideline Levels for Mercury in Fish (CAC/GL 7-1991)*; FAO/WHO Commission (19th Session): Rome, 1991. www.fao.org/docrep/meeting/005/t0490e/t0490e00.htm.
- (29) Agência Nacional de Águas Website. <http://www.ana.gov.br>.

- (30) Roulet, M.; Lucotte, M.; Guimarães, J. R. D.; Rheault, I. Methylmercury in water, seston and epiphyton of an Amazonian river and its floodplain, Tapajós river, Brazil. *Water, Air, Soil Pollut.* **2001**, *128*, 41–60.
- (31) Melack, J. M.; Hess, L. Remote Sensing of the Distribution and Extent of Wetlands in the Amazon Basin. In *Amazon Floodplain Forests*; Junk, J. J., Piedade, M. T. F., Wittmann, F., Schongart, J., Parolin, P., Eds.; Springer: New York, 2010; pp 60.
- (32) Fowler, S. W.; Heyraud, M.; La Rosa, J. Factors affecting methyl and inorganic mercury dynamics in mussels and shrimp. *Mar. Biol.* **1978**, *46*, 267–276.
- (33) Malm, O.; Palermo, E. F. A.; Santos, H. S. B.; Rebelo, M. F.; Kehrig, H. A.; Oliveira, R. B.; Meire, R. O.; Pinto, F. N.; Moreira, L. P. A.; Guimarães, J. R. D.; Torres, J. P. M.; Pfeiffer, W. C. Transport and cycling of mercury in Tucuruí reservoir, Amazon, Brazil: 20 years after fulfillment. *RMZ – Mater. Geoenviron.* **2004**, *51*, 1195–1198.
- (34) Kuwabara, J. S.; Topping, B. R.; Moon, G. E.; Husby, P.; Lincoff, A.; Carter, J. L.; Croteau, M. N. *Mercury Accumulation by Lower Trophic-Level Organisms in Lentic Systems within the Guadalupe River Watershed, California*; Scientific Investigations Report 2005-5037; U.S. Geological Survey: Menlo Park, CA, 2005.
- (35) Stewart, A. R.; Saiki, M. K.; Kuwabara, J. S.; Alpers, C. N.; Marvin-DiPasquale, M.; Krabbenhoft, D. P. Influence of plankton mercury dynamics and trophic pathways on mercury concentrations of top predator fish of a mining-impacted reservoir. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **2008**, *65*, 2351–2366.
- (36) Wang, Q.; Feng, X.; Yang, Y.; Yan, H. Spatial and temporal variations of total and methylmercury concentrations in plankton from a mercury-contaminated and eutrophic reservoir in Guizhou Province, China. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30* (12), 2739–2747.
- (37) Tremblay, A.; Lucotte, M.; Schetagne, R. Total mercury and methylmercury accumulation in zooplankton of hydroelectric reservoirs in northern Québec (Canada). *Sci. Total Environ.* **1998**, *213*, 307–315.
- (38) Plourde, Y.; Lucotte, M.; Pichet, P. Contribution of suspended particulate matter and zooplankton to MeHg contamination of the food chain in midnorthern Quebec (Canada) reservoirs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **1997**, *54* (4), 821–831.
- (39) Cruz, S. V. *Alimentação de espécies piscívoras do gênero Cichla spp., no Reservatório de Balbina Município de Presidente Figueiredo/AM*. Relatório PIBIC, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil, 2012.
- (40) Oliveira Jr, A. B. Táticas alimentares e reprodutivas do tucunaré-comum (*Cichla monoculus*, Agassiz, 1813) no reservatório da UHE de Balbina-AM. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil, 1998.
- (41) Rabelo, H.; Araújo-Lima, C. A. R. M. A dieta e o consumo diário de alimento de *Cichla monoculus* na Amazônia Central. *Acta Amaz.* **2002**, *32* (4), 707–724.
- (42) Novaes, J. L. C.; Caramaschi, E. P.; Winemiller, K. O. Feeding of *Cichla monoculus* Spix, 1829 (Teleostei: Cichlidae) during and after reservoir formation in the Tocantins River, Central Brazil. *Acta Limnol. Bras.* **2004**, *16* (1), 41–49.
- (43) Claro, L. H., Jr. A influência da floresta alagada na estrutura trófica de comunidades de peixes em lagos de várzea da Amazônia Central. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 2003.
- (44) Leite, R. G. Alimentação e hábitos alimentares dos peixes do rio Uatumã, na área de abrangência da usina hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil. M.Sc. Dissertation, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brazil, 1987.
- (45) Santos, G. M.; Ferreira, E.; Zuanon, J. *Peixes Comerciais de Manaus*; Ed. INPA: Manaus, Brazil, 2006.
- (46) Mol, J. H.; Ramlall, J. S.; Lietar, C.; Verloo, M. Mercury contamination in freshwater, estuarine, and marine fishes in relation to small-scale gold mining in Suriname, South America. *Environ. Res.* **2001**, *86*, 183–197.
- (47) Petrick, F. R. Bindung und akkumulation Von quecksilber in den vom goldabbau kontaminierten flusssedimenten des Rio Madeira, Rondônia, Brasilien. M.Sc. Dissertation, Ludwig Maximilians Universität, Munich, Bavaria, 1993.
- (48) Brinkmann, L.; Rasmussen, J. B. High levels of mercury in biota of a new Prairie irrigation reservoir with a simplified food web in Southern Alberta, Canada. *Hydrobiologia* **2010**, *641*, 11–21.
- (49) French, K. J.; Anderson, M. R.; Scruton, D. A.; Ledrew, L. J. Fish mercury levels in relation to characteristics of hydroelectric reservoirs in Newfoundland, Canada. *Biogeochemistry* **1998**, *40* (2/3), 217–233.
- (50) Durrieu, G.; Maury-Brachet, R.; Boudou, A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon basin). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2005**, *60*, 315–323.

Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream
from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil

Daniele Kasper, Bruce R. Forsberg, João H. F. Amaral, Rafael P. Leitão, Sarah S. Py-Daniel, Wanderley
R. Bastos, Olaf Malm

2 pages; 1 figure

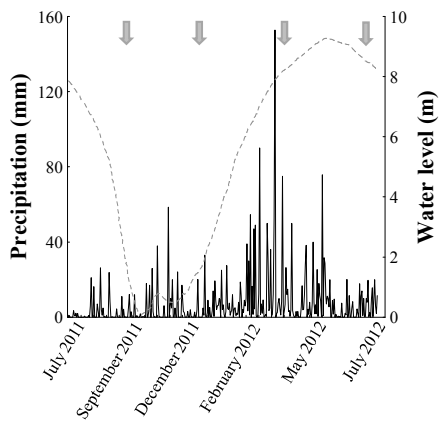


Figure S1. Precipitation at Balbina reservoir (black continuous line) and water level of the Amazon river near the Uatumã's mouth (grey dashed line) along the sampling year. Grey arrows indicate the sampling periods.

Avaliação de tese de doutorado

Título: DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM ECOSISTEMAS FLUVIAIS AMAZÔNICOS

Aluno: DANIELE KASPER

Orientador: BRUCE RIDER FORSBERG

Co-orientador:

Avaliador: PEDRO S. FADINI (DQ-UFSCar)

Por favor, marque a alternativa que considerar mais apropriada para cada item abaixo, e marque seu parecer final no quadro abaixo

	Muito bom	Bom	Necessita revisão	Reprovado
Relevância do estudo	(X)	()	()	()
Revisão bibliográfica	(X)	()	()	()
Desenho amostral/experimental	(X)	()	()	()
Metodologia	(X)	()	()	()
Resultados	(X)	()	()	()
Discussão e conclusões	(X)	()	()	()
Formatação e estilo texto	(X)	()	()	()
Potencial para publicação em periódico(s) indexado(s)	(X)	()	()	()

PARECER FINAL

(X) **Aprovada** (indica que o avaliador aprova o trabalho sem correções ou com correções mínimas)

() **Aprovada com correções** (indica que o avaliador aprova o trabalho com correções extensas, mas que não precisa retornar ao avaliador para reavaliação)

() **Necessita revisão** (indica que há necessidade de reformulação do trabalho e que o avaliador quer reavaliar a nova versão antes de emitir uma decisão final)

() **Reprovada** (indica que o trabalho não é adequado, nem com modificações substanciais)



São Carlos, SP, 27/11/2013, _____

Prof. Dr. Pedro S. Fadini

Comentários e sugestões podem ser enviados como uma continuação desta ficha, como arquivo separado ou como anotações no texto impresso ou digital da tese. Por favor, envie a ficha assinada, bem como a cópia anotada da tese e/ou arquivo de comentários por e-mail para pgeecologia@gmail.com e flaviacosta001@gmail.com ou por correio ao endereço abaixo. O envio por e-mail é preferível ao envio por correio. Uma cópia digital de sua assinatura será válida.

Endereço para envio de correspondência:

Flávia Costa
DCEC/CPEC/INPA
CP 478
69011-970 Manaus AM
Brazil

São Carlos, 27 de novembro de 2013

Parecer sobre a Tese “DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM
ECOSSISTEMAS FLUVIAIS AMAZÔNICOS”

Aluna: DANIELE KASPER

Orientador: BRUCE R. FORSBERG

O trabalho está muito bem redigido, conta com amplo amparo bibliográfico e discussões profundas e conduzidas com segurança sobre a questão da metilação do mercúrio em ecossistemas aquáticos amazônicos. Trata-se de uma contribuição pioneira acerca deste tema para o ambiente amazônico, com alto potencial para publicação em periódicos internacionais de grande relevância e com consequentes divulgações destes importantes resultados científicos e ampliação da projeção do valioso Programa de Pós-graduação em Ecologia do INPA.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Pedro S. Fadini

Avaliação de tese de doutorado

Título: DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM ECOSISTEMAS FLUVIAIS AMAZÔNICOS

Aluno: DANIELE KASPER

Orientador: BRUCE RIDER FORSBERG Co-orientador:

Avaliador:

Por favor, marque a alternativa que considerar mais apropriada para cada item abaixo, e marque seu parecer final no quadro abaixo

	Muito bom	Bom	Necessita revisão	Reprovado
Relevância do estudo	(x)	()	()	()
Revisão bibliográfica	(x)	()	()	()
Desenho amostral/experimental	(x)	()	()	()
Metodologia	(x)	()	()	()
Resultados	(x)	()	()	()
Discussão e conclusões	(x)	()	()	()
Formatação e estilo texto	(x)	()	()	()
Potencial para publicação em periódico(s) indexado(s)	(x)	()	()	()

PARECER FINAL

Aprovada (indica que o avaliador aprova o trabalho sem correções ou com correções mínimas)

Aprovada com correções (indica que o avaliador aprova o trabalho com correções extensas, mas que não precisa retornar ao avaliador para reavaliação)

Necessita revisão (indica que há necessidade de reformulação do trabalho e que o avaliador quer reavaliar a nova versão antes de emitir uma decisão final)

Reprovada (indica que o trabalho não é adequado, nem com modificações substanciais)

Rio de Janeiro, 5/12/2013



Prof. Jean Remy David Guimarães
Chefe do Laboratório de Traçadores
IBCCF/UFPA/Inat. SIAPE 957016

Comentários e sugestões podem ser enviados como uma continuação desta ficha, como arquivo separado ou como anotações no texto impresso ou digital da tese. Por favor, envie a ficha assinada, bem como a cópia anotada da tese e/ou arquivo de comentários por e-mail para pgecologia@gmail.com e flaviacosta001@gmail.com ou por correio ao endereço abaixo. O envio por e-mail é preferível ao envio por correio. Uma cópia digital de sua assinatura será válida.

Endereço para envio de correspondência:

Flávia Costa
DCEC/CPEC/INPA
CP 478
69011-970 Manaus AM
Brazil

Avaliação de tese de doutorado

Título: DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM ECOSISTEMAS FLUVIAIS AMAZÔNICOS

Aluno: DANIELE KASPER

Orientador: BRUCE RIDER FORSBERG

Co-orientador:

Avaliador: Reinaldo Luiz Bozelli

Por favor, marque a alternativa que considerar mais apropriada para cada item abaixo, e marque seu parecer final no quadro abaixo

	Muito bom	Bom	Necessita revisão	Reprovado
Relevância do estudo	(X)	()	()	()
Revisão bibliográfica	(X)	()	()	()
Desenho amostral/experimental	(X)	()	()	()
Metodologia	(X)	()	()	()
Resultados	(X)	()	()	()
Discussão e conclusões	(X)	()	()	()
Formatação e estilo texto	(X)	()	()	()
Potencial para publicação em periódico(s) indexado(s)	(X)	()	()	()

PARECER FINAL

Aprovada (indica que o avaliador aprova o trabalho sem correções ou com correções mínimas)

Aprovada com correções (indica que o avaliador aprova o trabalho com correções extensas, mas que não precisa retornar ao avaliador para reavaliação)

Necessita revisão (indica que há necessidade de reformulação do trabalho e que o avaliador quer reavaliar a nova versão antes de emitir uma decisão final)

Reprovada (indica que o trabalho não é adequado, nem com modificações substanciais)

Rio de Janeiro, 18 de dezembro de 2013.
Local Data



Assinatura

Comentários e sugestões podem ser enviados como uma continuação desta ficha, como arquivo separado ou como anotações no texto impresso ou digital da tese. Por favor, envie a ficha assinada, bem como a cópia anotada da tese e/ou arquivo de comentários por e-mail para pgecologia@gmail.com e flaviacosta001@gmail.com ou por correio ao endereço abaixo. O envio por e-mail é preferível ao envio por correio. Uma cópia digital de sua assinatura será válida.

Endereço para envio de correspondência:

Flávia Costa
DCEC/CPEC/INPA
CP 478
69011-970 Manaus AM
Brazil

Sugestões para ajustes no texto:

- Sugiro incluir no resumo/abstract conclusão sobre resultados apresentados
- Explicar se este trabalho encontrou formas de contornar os problemas metodológicos e logísticos para superar as principais dificuldades associadas às determinações das concentrações de mercúrio na Amazônia.
- Inserir na introdução geral um parágrafo sobre o estado da arte da investigação do ciclo do mercúrio em escala global.
- No objetivo geral, restringir aos sistemas fluviais efetivamente estudados. Por ex., os igarapés não entram.
- Conclusões do primeiro trabalho precisam ser ajustadas para efetivamente terem formato de conclusão. Como estão, se assemelham a resultados.
- Tabela 1, incluir o n das amostras.
- Incluir na legenda das figuras, quando não estiver, o período das amostras.
- Acho que a escalada legenda da figura 8 não está clara.

Artigo 2

- Não entendi o que é abstract art.
- Introdução do artigo poderia apresentar breve estado da arte para a questão estratificação x mercúrio.
- Dar informações, ainda que qualitativas sobre a composição do zooplâncton coletado, ao menos em grandes grupos.
- Você saberia dizer se zoo se assemelhava entre estações de coleta?
- Seria possível oferecer informações gerais sobre o reservatório, tais como prof. Média, tempo de residência, variação de nível,, etc.?
- Material filtrado continha detritos?
- Existe uma conclusão para o artigo?
- Completar legendas, incluindo período de amostragem.

Avaliação de tese de doutorado

Título: DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM ECOSISTEMAS FLUVIAIS AMAZÔNICOS

Aluno: DANIELE KASPER

Orientador: BRUCE RIDER FORSBERG

Co-orientador:

Avaliador: Helena do Amaral Kehrig

Por favor, marque a alternativa que considerar mais apropriada para cada item abaixo, e marque seu parecer final no quadro abaixo

	Muito bom	Bom	Necessita revisão	Reprovado
Relevância do estudo	(X)	()	()	()
Revisão bibliográfica	(X)	()	()	()
Desenho amostral/experimental	()	(X)	()	()
Metodologia	()	()	(X)	()
Resultados	(X)	()	()	()
Discussão e conclusões	(X)	()	()	()
Formatação e estilo texto	(X)	()	()	()
Potencial para publicação em periódico(s) indexado(s)	()	(X)	()	()

PARECER FINAL

() **Aprovada** (indica que o avaliador aprova o trabalho sem correções ou com correções mínimas)

(X) **Aprovada com correções** (indica que o avaliador aprova o trabalho com correções extensas, mas que não precisa retornar ao avaliador para reavaliação)

() **Necessita revisão** (indica que há necessidade de reformulação do trabalho e que o avaliador quer reavaliar a nova versão antes de emitir uma decisão final)

() **Reprovada** (indica que o trabalho não é adequado, nem com modificações substanciais)

Rio de Janeiro, 21 de novembro de 2013,


Assinatura

Comentários e sugestões podem ser enviados como uma continuação desta ficha, como arquivo separado ou como anotações no texto impresso ou digital da tese. Por favor, envie a ficha assinada, bem como a cópia anotada da tese e/ou arquivo de comentários por e-mail para pgecologia@gmail.com e flaviacosta001@gmail.com ou por correio ao endereço abaixo. O envio por e-mail é preferível ao envio por correio. Uma cópia digital de sua assinatura será válida.

Endereço para envio de correspondência:

Flávia Costa
DCEC/CPEC/INPA
CP 478
69011-970 Manaus AM
Brazil

Comentários:

A tese está muito boa no formato de manuscritos. A tese é um excelente trabalho. Os manuscritos são muito bons, principalmente o segundo.

O segundo manuscrito foi redigido com um formato muito agradável para leitura. O texto está muito interessante, e foi submetido a uma excelente revista.

Dúvida: voce liofilizou as amostras de peixe e plâncton? Voce não mencionou.

O único detalhe que faltou nele foi indicar se as concentrações de MeHg foram em peso seco ou peso úmido.

No segundo texto gostaria de observar que: escrever Total mercury levels e MeHg levels não está correto, uma vez que, na realidade voce tem Total mercury concentrations e MeHg concentrations. Concentração tem unidade, Levels (níveis) não tem unidade. Queira fazer esta correção.

Outro detalhe, ora voce escreve total mercury e ora mercury. Padronize.

A Prof Dra. Christina Castelo Branco, me explicou que devemos colocar microplâncton, mesoplâncton etc em função da malha de rede, e não fitoplâncton e zooplâncton.

Já o primeiro manuscrito, por causa da grande quantidade de dados e parâmetros, precisei lê-lo com mais dedicação, para poder digeri-lo melhor. Entretanto, os resultados encontrados são muito importantes.

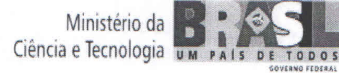
No primeiro texto gostaria de observar que: escrever MeHg levels não está correto, uma vez que, na realidade voce tem MeHg concentrations. Concentração tem unidade, Levels (níveis) não tem unidade. Queira fazer esta correção.

As figuras 8 e 9 do primeiro texto foram apresentadas muito rapidamente. Olhando para elas, voce pode observar que cada uma ocupa uma página. Alem disso, as duas figuras precisam ser mais descritas e discutidas. Voce coloca traços mais largos e mais finos, o fluxo dos rios não são indicados. Acho que o traço mais fino, por exemplo na figura 9, representa uma menor entrada de MeHg e o mais grosso uma maior entrada. A distância começa em que ponto? Voce deve explicar melhor essas duas figuras. Estão um pouco difíceis de serem entendidas. Voce deve explora-las melhor.

Na figura 1 da introdução, voce precisa indicar em cada imagem, rio de águas brancas, pretas e claras. Voce só colocou as imagens e nada indicou.

Senti falta de um capítulo a parte sobre Materiais e Métodos, já que estamos falando de uma tese. Nos artigos so colocamos, este tópico de forma muito rápida, como voce o fez. O que está correto. Mas devemos pensar que esta tese servirá de base para outros estudos. E como fazer esses novos estudos, se voce não ensinou o caminho das pedras. A coleta de água, já esta muito bem documentada na literatura da EPA, mas a metodologia para MeHg é nova, no Brasil. Não há nenhum artigo científico, em uma revista, a descrevendo. Tanto que voce não fez nenhuma citação. Assim eu sugiro, inserir um capítulo a este respeito. É muito importante.

APÊNDICE C



AULA DE QUALIFICAÇÃO

PARECER

Aluno(a): DANIELE KASPER
Curso: ECOLOGIA
Nível: DOUTORADO
Orientador(a): BRUCE FORSBERG

Título:

"Foto-redução do mercúrio e foto-degradação do metilmercúrio em igarapés da bacia do rio Jaú, Amazonas: utilizando o conceito do rio contínuo".

BANCA JULGADORA:

TITULARES:

Andrea Waichman (UFAM)
Bruce Walker Nelson (INPA)
Carlos Edwar Freitas (UFAM)
Fabiola Waldez (INPA)
Rubens Honda (NILTON LINS)

SUPLENTE:

Assad Darwich (INPA)
Jansen Zuanon (INPA)

EXAMINADORES	PARECER	ASSINATURA
Andrea Waichman (UFAM)	() Aprovado () Reprovado	
Bruce Walker Nelson (INPA)	(X) Aprovado () Reprovado	<i>Bruce</i>
Carlos Edwar Freitas (UFAM)	(X) Aprovado () Reprovado	<i>C. Freitas</i>
Fabiola Waldez (INPA)	(X) Aprovado () Reprovado	<i>Fabiola Waldez</i>
Rubens Honda (NILTO LINS)	(X) Aprovado () Reprovado	<i>Rubens Honda</i>
Assad Darwich (INPA)	() Aprovado () Reprovado	
Jansen Zuanon (INPA)	(X) Aprovado () Reprovado	<i>Jansen Zuanon</i>

Manaus(AM), 04 de dezembro de 2009

OBS: _____

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA TROPICAL E RECURSOS NATURAIS - PIPG BTRN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA PPG-ECO/INPA

Av. Efigênio Sales, 2239 - Bairro: Adrianópolis - Caixa Postal: 478 - CEP: 69.011-970, Manaus/AM.
Fone: (+55) 92 3643-1909
site: <http://pg.inpa.gov.br>

Fax: (+55) 92 3643-1909
e-mail: pgeco@inpa.gov.br



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE
DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS
DA AMAZÔNIA

Aos 30 dias do mês de abril do ano de 2014, às 14:00 horas, no Auditório do Programa de Pós Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior - PPG BADPI/INPA, reuniu-se a Comissão Examinadora de Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: o(a) Prof(a). Dr(a). **Ézio Sargentini Júnior**, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, o(a) Prof(a). Dr(a). **Bruce Gavin Marshall**, do Centro Universitário do Norte – UNINORTE, e o(a) Prof(a). Dr(a). **Sandra Beltran Pedreros**, da Faculdade La Salle, tendo como suplentes o(a) Prof(a). Dr(a). Sávio José Filgueiras Ferreira, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, e o(a) Prof(a). Dr(a). Rafael Mendonça Duarte, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, sob a presidência do(a) primeiro(a), a fim de proceder a arguição pública do trabalho de **TESE DE DOUTORADO** de **DANIELE KASPER**, intitulado “DINÂMICA SAZONAL DO METILMERCÚRIO EM ECOSISTEMAS FLUVIAIS AMAZÔNICOS”, orientado pelo(a) Prof(a). Dr(a). Bruce Rider Forsberg, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

Após a exposição, o(a) discente foi argüido(a) oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final:

APROVADO(A) REPROVADO(A)
 POR UNANIMIDADE POR MAIORIA

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que, após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

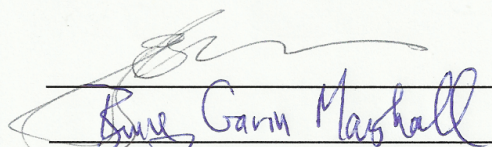
Prof(a).Dr(a). Ézio Sargentini Júnior

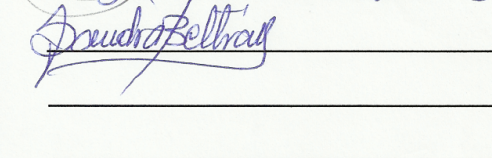
Prof(a).Dr(a). Bruce Gavin Marshall

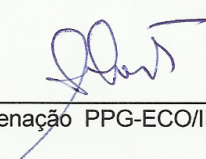
Prof(a).Dr(a). Sandra Beltran Pedreros

Prof(a).Dr(a). Sávio José F. Ferreira

Prof(a).Dr(a). Rafael Mendonça Duarte







Coordenação PPG-ECO/INPA