



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ALTAMIRA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E  
CONSERVAÇÃO**

**BRUNO GONÇALVES BAHIANA**

**EXPLORANDO A BIODIVERSIDADE DO RIO XINGU: apresentação e validação  
de um novo equipamento de amostragem de DNA Ambiental**

**ALTAMIRA-PA**

**2024**



BRUNO GONÇALVES BAHIANA

**EXPLORANDO A BIODIVERSIDADE DO RIO XINGU:** apresentação e validação de um novo equipamento de amostragem de DNA Ambiental

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Tommaso Giarrizzo

Coorientador: Prof. Dr. Friedrich Wolfgang Keppeler

ALTAMIRA-PA

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

B151e Bahiana, Bruno Gonçalves.  
Explorando a biodiversidade do rio Xingu: : apresentação e  
validação de um novo equipamento de amostragem de DNA  
ambiental / Bruno Gonçalves Bahiana. — 2024.  
ix, 36 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Tommaso Giarrizzo  
Coorientador(a): Prof. Dr. Friedrich Wolfgang Keppeler  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,  
Campus Universitário de Altamira, Programa de Pós-Graduação  
em Biodiversidade e Conservação, Altamira, 2024.

1. DNA ambiental. 2. biologia molecular. 3.  
biodiversidade. 4. rio Xingu. 5. Amazônia. I. Título.

CDD 577.09811

---

BRUNO GONÇALVES BAHIANA

**EXPLORANDO A BIODIVERSIDADE DO RIO XINGU:** apresentação e validação  
de um novo equipamento de amostragem de DNA Ambiental

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação.

Data da aprovação: 29/04/2024

**Banca Examinadora:**

Paulo Arthur de Abreu Trindade

Examinador externo – Universidade Federal do Amazonas

José Amorim Reis-Filho

Examinador externo – Universidade Federal da Bahia

Emil José Hernández Ruz

Examinador interno – Universidade Federal do Pará

## AGRADECIMENTOS

A toda minha família, em especial aos meus pais, Mara Bahiana e Carlos Bahiana, pelos ensinamentos, suporte e amor incondicionais; mas também pelo sacrifício de me ter tão longe e há tanto tempo. Ao meu companheiro de vida, Eduardo Dantas, cujos amor, incentivo e paciência formaram o alicerce perfeito, a atmosfera e o cenário ideais para a conclusão desse sonho: o mestrado.

Ao meu orientador, o professor Dr. Tommaso Giarrizzo e ao meu coorientador, Dr. Friedrich Keppeler, pela oportunidade de poder realizar um projeto de mestrado tão especial sobre uma metodologia inovadora que é o DNA ambiental; bem como pelos ensinamentos, estímulos e encorajamento.

Aos colegas da UFPA, Pedro Rocha, Alexandre Villela e Fábio Miranda, que foram essenciais para o sucesso do trabalho.

Aos pesquisadores Stefano Mariani, da Escola de Ciências Ambientais e Biológicas da Universidade Liverpool John Moores - Reino Unido; Tommaso Russo e Giulia Maiello, pesquisadores do Departamento de Biologia da Universidade de Roma Tor Vergata - Itália; ambos os responsáveis pelo processamento do eDNA, pelas análises de bioinformática e pela contribuição na escrita do artigo que, tão logo possível, será submetido a uma revista científica.

Aos colegas de mestrado Natally Gama e Wesley Storch, que me apoiaram constantemente durante essa jornada acadêmica, mas também ao amigo Raoni Rodrigues, que contribuiu bastante na etapa final de elaboração desta dissertação.

À empresa Norte Energia, concessionária da UHE Belo Monte, que autorizou a coleta, disponibilizou as imagens do SVI e que vem contribuindo fortemente para a produção científica e para o desenvolvimento sustentável da região do Médio Xingu, através dos seus monitoramentos e das ações socioambientais. À Silvia Cabral, pela compreensão, pelos estímulos e pela liderança inspiradora que vem fazendo toda a diferença no meu crescimento pessoal e profissional.

Por fim, a todo o corpo docente, à Secretaria, nomeadamente à Francilene Cerqueira, e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação PPGBC/UFPA.

“Alguém me avisou pra pisar nesse chão  
devagarinho”

Ivone Lara

## RESUMO

O conhecimento e monitoramento da biodiversidade se configuram como elementos-chaves para a definição de ações e iniciativas focadas na conservação e restauração da natureza. No entanto, técnicas de monitoramento são geralmente caras e demoradas, o que dificulta esforços para a identificação e manejo da diversidade biológica. Nesse sentido, é imprescindível o desenvolvimento de novos métodos rápidos, não invasivos e de baixo custo que possam trazer resultados e informações confiáveis e robustas, destacando-se, nesse contexto, as abordagens baseadas no uso do DNA ambiental (eDNA). O eDNA é uma mistura complexa de material genético oriundo de organismos inteiros ou partes deles, presentes em matrizes ambientais, que podem ser, por exemplo, de solo, água ou sedimento. O presente projeto apresenta um protótipo de equipamento simples e de baixo custo para obter amostragem de eDNA, visando explorar a riqueza e composição da ictiofauna no Sistema de Transposição de Peixes (STP) da Usina Hidrelétrica Belo Monte, localizado no curso médio do rio Xingu, um rio hiperdiverso localizado na Amazônia brasileira. Para tanto, fabricou-se um novo e acessível equipamento para coleta passiva de material genético (eDNA) a partir de uma estrutura metálica e dois tubos de PVC. Um medidor de vazão foi acoplado a um dos tubos e dois rolos de gaze foram firmemente fixados ao outro tubo. A partir das amostras, que foram coletadas a cada duas horas durante um período de 24 horas, foi gerado um inventário de espécies usando uma combinação de marcadores moleculares específicos de peixes (Tele02 12S). Para a validação do equipamento e da metodologia proposta, a variação temporal da riqueza e composição da ictiofauna detectada com eDNA foram comparadas com as registradas no monitoramento utilizando o Sistema de Vídeo-Imagem (SVI) localizado na saída do STP. Os resultados indicam que o método foi eficiente e amostrou 100% das ordens da ictiofauna que foi registrada no monitoramento com SVI, mas a similaridade entre os dois métodos foi reduzindo à medida que aumentava-se a especificidade taxonômica. Esse resultado pode ser explicado pela baixa representatividade das espécies do Xingu nas bibliotecas genômicas existentes. Neste sentido, o eDNA é uma abordagem promissora e com grande potencial de se tornar uma ferramenta valiosa para estudar e monitorar a composição de peixes em rios tropicais de água doce altamente diversificados com custos acessíveis e impactos mínimos sobre organismos e habitats, mas que, nesse momento, precisa de mais pesquisa de base para que possa vir substituir e/ou complementar os métodos tradicionais de amostragem.

Palavras-chave: DNA ambiental; biologia molecular; monitoramento ambiental; biodiversidade; rio Xingu; Amazônia.

## ABSTRACT

Knowledge and monitoring of biodiversity are key elements for defining actions and initiatives focused on nature conservation and restoration. However, monitoring techniques are generally expensive and time-consuming, which complicates efforts to identify and manage biological diversity. In this sense, it is essential to investigate new fast, non-invasive and low-cost methods that can provide reliable and robust results and information, highlighting, in this context, approaches based on the use of environmental DNA (eDNA). eDNA is a complex mixture of genetic material originating from entire organisms or parts of them, present in environmental matrices, which can be, for example, soil, water or sediment. This project presents a prototype of a simple and low-cost equipment to obtain eDNA sampling, aiming to explore the richness and composition of the ichthyofauna in the Fish Transposition System of the Belo Monte Hydroelectric Power Plant (HPP), located in the middle course of the Xingu River, a hyperdiverse river located in the Amazon Brazilian. To this end, a new and affordable piece of equipment was manufactured for passive collection of genetic material (eDNA) using a metal structure and two PVC tubes. A flow meter was attached to one of the tubes and two rolls of gauze were firmly attached to the other tube. From the samples, which were collected every two hours over a 24-hour period, a species inventory was generated using a combination of fish-specific molecular markers (Tele02 12S). To validate the equipment and the proposed methodology, the temporal variation in the richness and composition of the fish fauna detected with eDNA were compared with those recorded during monitoring using the Video-Image System located at the exit of the STP. The results indicate that the method was efficient and sampled 100% of the ichthyofauna orders that were recorded in monitoring with SVI, but the similarity between the two methods reduced as taxonomic specificity increased. This result can be explained by the low representation of Xingu species in existing genomic libraries. In this sense, eDNA is a promising approach with great potential to become a valuable tool for studying and monitoring the composition of fish in highly diverse tropical freshwater rivers with affordable costs and minimal impacts on organisms and habitats, but which, in this At the moment, more basic research is needed so that it can replace and/or complement traditional sampling methods.

Keywords: Environmental DNA; molecular biology; environmental monitoring; biodiversity; Xingu River; Amazon.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	12
2.1. Área de Estudo .....	12
2.2. Amostragem de eDNA .....	15
2.3. Processamento do eDNA .....	17
2.4. Análises de bioinformática .....	19
2.5. Estimativa da riqueza pelo Sistema de Vídeo-Imagem .....	19
2.6. Análise dos dados .....	20
<b>3 RESULTADOS</b> .....	21
<b>4 DISCUSSÃO</b> .....	26
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	30

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento e monitoramento da biodiversidade se configuram como elementos-chave para a definição de ações e iniciativas focadas na conservação e restauração da natureza. Nesse sentido, a geração de informações sobre a diversidade biológica para orientar as decisões de gestão e formular políticas públicas voltadas para o uso sustentável dos recursos e conservação dos ecossistemas são fundamentais (LINDENMAYER; LIKENS, 2010). Os programas de monitoramento exigem métodos de amostragem acessíveis que produzam dados padronizados e confiáveis para atingir seus objetivos de identificação da biodiversidade e caracterização da sua variação espaço-temporal. No entanto, as técnicas convencionais de monitoramento geralmente são invasivas, caras e necessitam de longos períodos de amostragem, impondo uma série de questões metodológicas como a necessidade de elevado número de equipe técnica, equipamentos e custos logísticos que oneram os esforços para a identificação, conservação e manejo da diversidade biológica. Dessa forma, conciliar custo amostral e acurácia dos dados apresenta-se como um grande desafio (GIULIA et al., 2023), principalmente em programas de monitoramento de longo prazo. Por essa razão, é imprescindível a investigação e desenvolvimento de novos métodos rápidos e de baixo custo que possam trazer resultados e informações confiáveis e robustas.

É nesse contexto que um novo método não invasivo vem ganhando cada vez mais espaço e revolucionando o monitoramento da biodiversidade – o metabarcoding do DNA ambiental (eDNA) (BYLEMANS et al., 2019; CINDY et al., 2021). Por meio desse método, são coletadas amostras de água, sedimento e/ou ar nas quais contêm DNA de organismos originados de material biológico vivo ou morto, como peles, mucosas, saliva, gametas e fezes (BARNES; TURNER, 2016; BOHMANN et al., 2014; FICETOLA et al., 2008; TABERLET et al., 2012). O protocolo de amostragem é relativamente simples, rápido e sem danos significativos às espécies e habitats alvo (ANTOGNAZZA et al., 2019; LEEMPOEL; HEBERT; HADLY, 2020; MORAN; PROSSER; MORAN, 2019). A partir das amostras, o eDNA é preservado, extraído, amplificado, sequenciado e categorizado (DEINER et al., 2015). Então, por meio da aplicação de métodos moleculares, como o uso de primers gerais ou universais em Reações em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), e ferramentas avançadas de bioinformática, pode-se determinar a presença de espécies e avaliar a biodiversidade.

O eDNA já provou ter um enorme potencial no monitoramento biológico (LACOURSIÈRE-ROUSSEL; ROSABAL; BERNATCHEZ, 2016). De fato, o número de estudos que utilizam esse método aumentou exponencialmente na última década, refletindo principalmente na redução dos custos associados às análises (BENG; CORLETT, 2020). O eDNA tem sido aplicado para detectar a ocorrência de espécies invasoras (GOLDBERG et al., 2013; KLYMUS et al., 2015), espécies nativas consideradas extintas ou ameaçadas (JERDE et al., 2011), assim como outras espécies não descritas que seriam difíceis de detectar por métodos tradicionais (FICETOLA et al., 2008; THOMSEN et al., 2012). No entanto, a abordagem eDNA ainda apresenta algumas limitações e lacunas importantes a serem superadas (MARQUES et al., 2021).

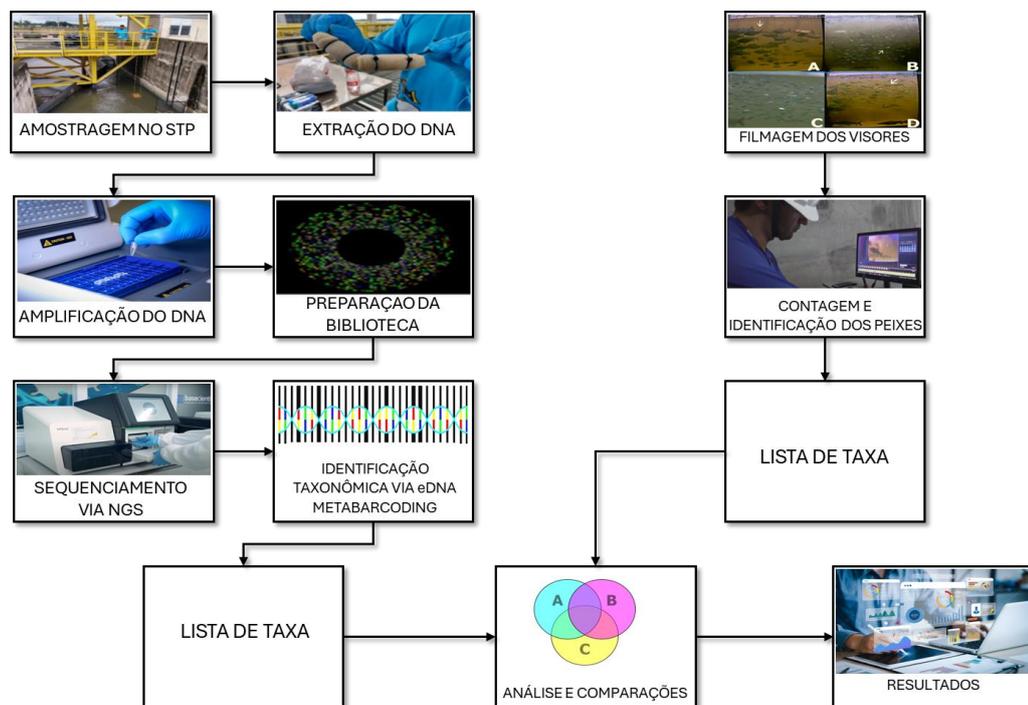
Muitos estudos de eDNA são baseados em métodos ativos que utilizam bombeamento e filtração de água, sendo que a principal limitação continua sendo a coleta e concentração de DNA de grandes volumes de água, que requerem ferramentas estéreis específicas (como filtros, bombas ou seringas) e que não são fáceis de obter e manter em áreas remotas, especialmente em países menos desenvolvidos. Outros estudos, por sua vez, fazem amostras pontuais e não abordam em profundidade o efeito da variação temporal nas análises. Isso é especialmente preocupante para certos ecossistemas, como aqueles em rios tropicais hiperdiversos, onde os processos ecológicos e a estrutura da comunidade variam consistentemente entre as estações (e.g., estação chuvosa vs. seca) (WINEMILLER, 1998) e períodos do dia (e.g., dia vs. noite) (ARRINGTON; WINEMILLER, 2003; COSTA; NOGUEIRA, 2016).

O uso de amostragem passiva de eDNA é uma solução promissora para expandir o entendimento, complementar e apresentar uma abordagem alternativa aos métodos tradicionais, ativos, de coleta de eDNA (CHEN et al, 2022; VERDIER et al, 2022). Nesse sentido, o objetivo principal desta dissertação é avaliar a performance de um novo equipamento de amostragem de coleta passiva de amostras de água para análise de DNA ambiental. Esse equipamento foi projetado para ter baixo custo, sendo acessível e de fácil manutenção em áreas remotas. Também foi explorado como o desenho amostral afetou a riqueza de espécies detectadas e como esta riqueza e a composição das espécies variaram ao longo de 24h. O novo método foi aplicado no Sistema de Transposição de Peixe (STP) da Usina Hidrelétrica Belo Monte, localizado no curso médio do rio Xingu, um rio hiperdiverso localizado na Amazônia brasileira. Para validar a capacidade do método de

identificar a riqueza e composição de espécies que passam pelo STP, utilizou-se informações provenientes do Sistema de Vídeo-Imagem (SVI) no STP da UHE Belo Monte. A hipótese avaliada é que a riqueza e composição de taxa identificados pelo novo método apresenta alta similaridade com aquelas obtidas no SVI. Também testamos diferenças entre amostras obtidas durante o dia e noite para verificar a capacidade do equipamento em capturar a variação nictemeral da ictiofauna.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos adotados no desenvolvimento desta pesquisa encontram-se resumidos no fluxograma da Figura 1 abaixo, e serão descritos detalhadamente na sequência.



**Figura 1.** Fluxograma do resumo da metodologia aplicada. Fonte: De autoria própria.

### 2.1. Área de Estudo

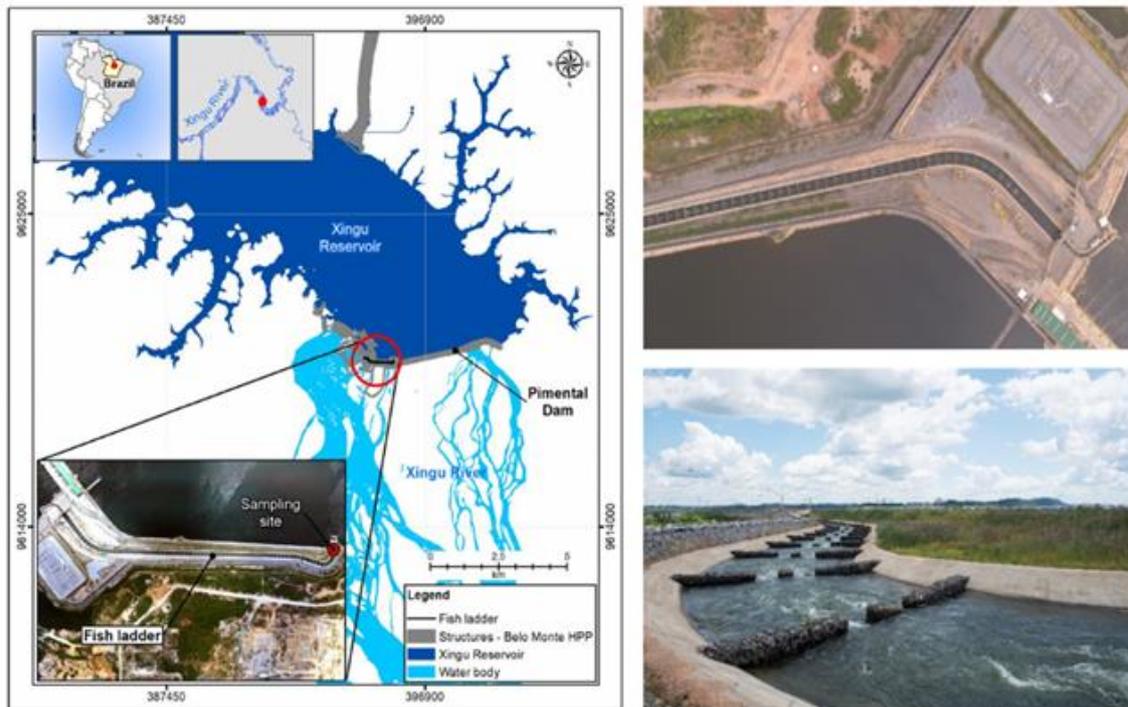
A bacia do rio Xingu está localizada na margem direita do rio Amazonas e cobre uma área total de aproximadamente 531.250 km<sup>2</sup> sobre os antigos e erodidos leitos rochosos do Escudo Brasileiro (LATRUBESSE; STEVAUX; SINHA, 2005). O rio Xingu é o maior rio de águas claras da bacia amazônica (i.e., baixos teores de nutrientes e

sedimentos em suspensão) (JUNK et al., 2011), estendendo-se por mais de 1.600 km, desde o encontro das Serras Formosa e do Roncador, região de savanas arbustivas no bioma Cerrado, até a confluência com o rio Amazonas (LATRUBESSE; STEVAUX; SINHA, 2005), localizada a cerca de 420 km do Oceano Atlântico. Mesmo com essa distância, a influência de marés oceânicas pode ser verificada até 100 km à montante da confluência, dentro do Xingu.

A bacia do rio Xingu é dividida em três compartimentos: o Alto Xingu, onde seus formadores são o rio Ferro, o rio Culuene e o rio Sete de Setembro. Dentro do Parque Indígena do Xingu, há a confluência com três importantes afluentes o Suiá-Miçu, Manissaua-Miçu e Arraias; no Médio Xingu, há dois principais afluentes: o rio Fresco, no município de São Félix do Xingu, e o rio Iriri, o seu afluente mais importante; Finalmente, no Baixo Xingu, o rio há a confluência com o rio Bacajá, outro grande afluente. Após a Volta Grande do Xingu, um trecho com muitas corredeiras, o rio se abre em um lago, formando uma ria fluvial, até sua foz na margem direita do rio Amazonas, na cidade de Porto de Moz (ÁGUAS AMAZONICAS, 2022).

O trecho Médio do rio Xingu destaca-se por sua cobertura florestal aluvial e uma extensa série de corredeiras conhecidas como Volta Grande que abriga níveis excepcionais de biodiversidade aquática endêmica (FITZGERALD et al., 2018). A vazão natural do rio nesta região varia sazonalmente, com valores baixos durante a estação seca ( $\sim 2.000 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  entre junho e novembro) e altos durante a estação chuvosa ( $\sim 8.000$  a  $20.000 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  entre dezembro e maio). O clima é tropical úmido com baixas oscilações de temperatura durante o ano ( $\sim 26 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (WALLACE et al., 2021).

O estudo foi realizado no Sistema de Transposição de Peixes (STP) do Complexo Hidroelétrico de Belo Monte (Figura 2), localizado no trecho Médio do rio Xingu (Pará). Vale destacar que o STP foi utilizado como sítio amostral por se tratar de um ambiente mais controlado, se comparado ao ambiente natural do rio, que, por sua vez, possui uma dinâmica mais complexa de dispersão e degradação do material genético circundante (eDNA) (MURAKAMI et al., 2022). Além disso, ele permite a validação do método por meio do Sistema de Vídeo-Imagem (SVI), que registra todos os peixes que passam pelo sistema.



**Figura 2.** Canal do Sistema de Transposição de Peixes (STP) do Complexo Hidrelétrico de Belo Monte. A esquerda, detalhe do local de amostragem, onde é identificado um ponto na saída do canal do STP no reservatório principal (círculo vermelho). À direita, imagens que ilustram as estruturas internas do STP. Fonte: De autoria própria.

O STP de Belo Monte é um canal de 1.200 metros de extensão que permite aos peixes transporem o barramento de Pimental, conectando os setores a montante - o reservatório principal do complexo hidroelétrico - e jusante - o trecho de vazão reduzida - do rio Xingu, viabilizando a manutenção dos movimentos dos peixes nesse trecho do rio, inclusive as migrações reprodutivas. O canal é subdividido em 80 tanques, cada um com 14 m de comprimento, declividade de 1,43% e com profundidade média de 2,5 m. Cada tanque é delimitado por diques de gabiões, que agem como dissipadores da energia da água, enquanto duas ranhuras verticais permitem a passagem dos peixes entre os tanques. Ao dissipar a energia da água, os gabiões também proporcionam áreas de baixa velocidade da água e permitem que os peixes descansem à medida que vão subindo o STP. Integrado a ele há ainda um sistema de água de atração, que aumenta a vazão do trecho final do STP, aumentando a atratividade para os peixes entrarem no STP e continuarem seus movimentos pelo rio.

Os peixes que transitam pelo STP de Belo Monte são contabilizados pelo Sistema de Vídeo-Imagem (SVI). Esse sistema está localizado próximo à saída do STP no reservatório, e é composto por um sistema de grades que direcionam os peixes para passarem próximo a dois visores de vidros de 2,00 x 2,00 m. Esses visores estão abertos a duas salas (direita e esquerda do STP, Figura 3) onde estão localizadas câmeras de alta resolução, acopladas a DVRs (do inglês *Digital Video Recorder*), que fazem a gravação contínua de imagens (24h por dia, 7 dias por semana). Dessa forma, é possível ter registro de virtualmente todos os peixes que passam pelo STP, seja no sentido jusante-montante, quanto no sentido inverso.



**Figura 3.** À esquerda, porção final do STP (montante) quando seco, com detalhe para os visores da sala direita e esquerda, indicados pelas setas vermelhas. À direita, o sistema de câmeras na figura de cima e, abaixo, a análise de imagens gravadas pelo Sistema Vídeo-Imagem (SVI). Fonte: Norte Energia, 2023.

## 2.2. Amostragem de eDNA

As amostras de eDNA foram coletadas nos dias 20 e 21 de maio de 2021, durante o período de cheia da região, quando o STP apresenta seu melhor funcionamento. Para a coleta, foi fabricado um equipamento feito de estrutura metálica contendo pesos para estabilizá-lo submerso na água. A estrutura metálica foi amarrada com uma corda de sisal torcida com o objetivo de emergir e submergir o equipamento na água.

Para maximizar a quantidade potencial de eDNA que passa pelas amostras, fixou-se à referida estrutura metálica dois tubos de policloreto de vinil (PVC), com 50,00 cm de comprimento e 15,00 cm de diâmetro. Dois rolos de gaze foram firmemente fixados



crucial para a recuperação máxima do DNA. Nesse sentido, as gazes recuperadas foram preservadas em tubos Falcon estéreis individualizados de 50 mL contendo grãos de sílica gel. A preservação dos filtros em grãos de sílica gel garante a manutenção da composição de eDNA da comunidade amostrada de forma mais consistente se comparada a outras técnicas de preservação, como o etanol (MAJANEVA et al., 2018). Os tubos contendo os rolos de gaze com a sílica gel foram mantidos em um refrigerador durante as coletas e, após 24 h, foram transportados em caixas de gelo até o Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), em Altamira, no Pará, onde permaneceram devidamente congelados e armazenados a -20°C. Na sequência, os tubos contendo os rolos de gaze com a sílica gel foram transportados em caixas com dióxido de carbono solidificado via transporte aéreo até o Laboratório do Departamento de Biologia da Universidade de Roma Tor Vergara, na Itália, onde as amostras de eDNA foram processadas e analisadas.

### 2.3. Processamento do eDNA

No laboratório da Universidade de Roma Tor Vergara, na Itália, cada rolo de gaze foi cortado em pequenos pedaços, homogeneizado e subamostrado (~ 2 x 2,00 cm), seguindo o protocolo de extração de DNA universal modular ou Mu-DNA (SELLERS et al., 2018). O DNA foi lisado durante a noite a 37°C com 730 µL de solução de lise (1 M Tris HCl (pH 8), 0,5 M EDTA (pH 8)), 250 µL de aditivo de lise de solo (180 mM de sulfato de amônio e alumínio dodeca-hidratado, 20% SDS) e 20 µL de proteinase K (100 µg/mL). Em seguida, o DNA foi extraído através das principais etapas do protocolo (i.e., remoção do inibidor, ligação à sílica, lavagem e eluição final) e ajustado de acordo com o volume inicial de DNA lisado. Dois negativos de extração (reagentes e água livre de nucleotídeos irradiados com UV) foram incluídos para monitorar possíveis contaminações relacionadas aos procedimentos de extração e reagentes.

O DNA extraído foi amplificado por PCR visando um fragmento de ~167 pb do gene 12S, usando os iniciadores (*primer*) Tele02 (*forward*: 5'-AAACTCGTGCCAGCCACC-3'; *reverse*: 5'-GGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'), que apresentam uma detecção de espécies de teleósteos em mais de 98% quando testadas *in silico* (TABERLET et al., 2018). Para identificar possíveis contaminações, inclui-se um positivo (*Sebastes mentella*, uma espécie marinha subártica) e dois controles de PCR negativos. Cada amostra foi amplificada anexando um oligo-*tag* exclusivo de 8 pb aos

*primers forward e reverse*, a fim de identificar as amostras de forma unívoca e reduzir contextualmente o risco de contaminação cruzada e/ou troca de *tags* durante o sequenciamento Illumina. Cada *tag* diferia em pelo menos três pares de bases de outras *tags* e era precedida por 2 a 4 bases degeneradas (Ns) para melhorar a diversidade de seqüências durante o sequenciamento.

As PCRs foram realizadas em triplicata sob as seguintes condições de termociclagem: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 30 segundos, e um alongamento final de 72°C por 5 min. Cada amostra foi amplificada em 20 µL de reações contendo 10 µL de MyFi™ Mix (*Meridian Bioscience*), 0,16 µL de albumina de soro bovino (20 mg/mL, *Thermo Scientific*), 5,84 µL de Água Destilada *UltraPure™* (*Invitrogen*), 1 µL de cada *primer forward e reverse* (10 µM, Eurofins) e 2 µL de DNA modelo. As réplicas foram então agrupadas e visualizadas em um gel de agarose a 2% corado com *SYBRsafe* (*Invitrogen*) para garantir a amplificação bem-sucedida dos fragmentos alvo. Os produtos de PCR foram purificados com esferas magnéticas *Mag-Bind® TotalPure NGS* (*Omega Biotek Inc.*), usando uma proporção de 1x das esferas magnéticas em 30 µL de produtos de PCR (BRONNER; QUAIL, 2019) e o DNA purificado foi quantificado usando um fluorômetro Qubit™ 4.0 com o kit *Qubit™ dsDNA HS Assay* (*Invitrogen*). Com base na concentração total de DNA, as amostras foram normalizadas e agrupadas em concentração equimolar para preparação de biblioteca. O reparo final, a ligação do adaptador e a amplificação da biblioteca por PCR foram realizados usando o kit *NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq 2.0* para plataformas *Illumina®* (*PerkinElmer*) de acordo com o protocolo do fabricante. A *Agilent 2200 TapeStation* e a *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (*Agilent Technologies*) indicaram que produtos secundários (por exemplo, dímeros adaptadores) permaneceram e estes foram removidos posteriormente por outra limpeza de esfera magnética de proporção 1x. A biblioteca foi gerada usando PCR quantitativo (qPCR) em um Rotor-Gene Q (*Qiagen*) com o kit *NEBNext® Library Quant para Illumina®* (*New England Biolabs*) e diluída a 1 nM com base na concentração de qPCR. Finalmente, a biblioteca foi sequenciada a 85 pM com 10% de controle PhiX em um *Illumina® iSeq™ 100* usando *il Reagent v2* (300 ciclos) (*Illumina Inc.*).

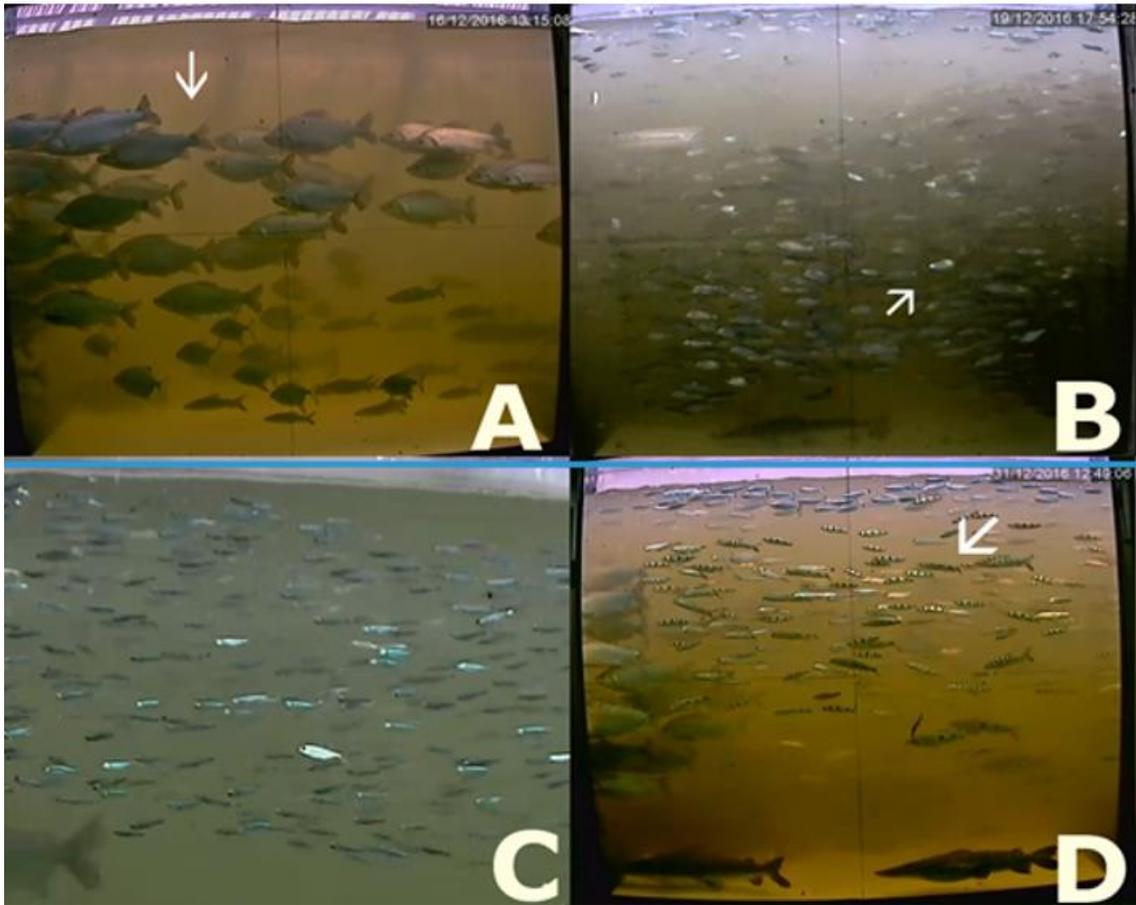
#### 2.4. Análises de bioinformática

Os procedimentos de bioinformática foram baseados no software OBITOOLS 1.2.11 (BOYER et al., 2016). A qualidade de leitura foi verificada com FASTQC e as extremidades de baixa qualidade foram cortadas para análise posterior. ILLUINAPAIREDEND foi usado para mesclar todas as leituras pareadas mostrando uma pontuação de qualidade > 40, e NGSFILTER para multiplicar amostras com base em seus códigos de barras exclusivos, permitindo uma única incompatibilidade de base. Após a demultiplicação, as sequências retidas foram filtradas via OBIGREP para remover *singletons* e leituras fora do intervalo de comprimento esperado (129-209 pb) e desreplcadas via OBIUNIQ. As quimeras foram removidas com UCHIME (EDGAR et al., 2011) e as sequências restantes foram agrupadas em *Molecular Operational Taxonomical Units* (MOTU) com SWARM (MAHÉ et al., 2015) definindo o limite para  $d=3$ .

O banco de dados 12S personalizado foi criado por meio de uma PCR *in silico* contra o banco de dados de vertebrados EMBL (versão de lançamento r143) implementado com ECOPCR. Primeiro, a taxonomia foi atribuída com ECOTAG e, em seguida, foi verificada a atribuição taxonômica pesquisando no banco de dados NCBI usando BLASTn. O conjunto de dados foi finalmente filtrado mantendo apenas as sequências mostrando correspondência de identidade >95% e removendo o ruído de contaminação potencial aproveitando os controles negativos com o pacote DECONTAM em R (DAVIS et al., 2018), usando o método de prevalência com um limite de 0,5.

#### 2.5. Estimativa da riqueza pelo Sistema de Vídeo-Imagem

Todos os peixes que passaram nos visores do SVI do STP nos dias 20 e 21 de maio de 2021, durante as 24h de estudo, foram identificados por um especialista em ictiofauna. Quando não foi possível identificar todos os indivíduos presentes nas imagens ao nível específico, devido à diversidade de espécies morfologicamente similares, à qualidade da água e, ocasionalmente, à presença de perifíton no visor, os indivíduos foram classificados no menor nível taxonômico possível. Para permitir a comparação com as amostras de eDNA, os vídeos foram separados nos mesmos intervalos em que foram feitas as amostras de eDNA, ou seja, a cada 2h entre às 9h30 do dia 20 de maio e às 7h30 do dia 21 de maio de 2021. A riqueza foi definida como sendo o número de espécies que foram registradas no visor nesse período.



**Figura 5.** Exemplos de imagem do visor do STP quando a contagem foi feita por estimativa. Setas indicam (A) *Prochilodus* spp., (B) *Characidae* (C) *Moenkhausia* spp. e D) *Leporinus* spp. Fonte: Norte Energia, 2016.

## 2.6. Análise dos dados

A comparação entre os dados de riqueza obtidos com o método de eDNA e com o SVI foi feito utilizando o teste de correlação de Pearson. Também comparamos o percentual de taxa identificadas no SVI que tiveram eDNA identificado, em quatro níveis taxonômicos diferentes: espécie, gênero, família e ordem, para acessar a incerteza relacionada a identificação taxonômica em ambos os métodos.

As curvas de rarefação foram elaboradas usando números de Hill (CHAO et al., 2014) para investigar a associação entre esforço amostral (ou seja, número de amostras) e a riqueza de espécies. Os números de Hill são um grupo de índices de diversidade que são definidos por uma ordem  $q$ . À medida que  $q$  aumenta, também aumenta a sensibilidade à abundância relativa das espécies. Para este estudo, foi utilizado  $q$  igual a

0, que é equivalente à riqueza de espécies. Dado que o fluxo de água que passa pelos tubos de PVC também pode ser considerado uma métrica de esforço amostral, foi realizada uma correlação entre o número de rotações do medidor de vazão e a riqueza de espécies. Curvas de rarefação e correlações foram conduzidas individualmente para cada réplica espacial (ou seja, os rolos de gaze paralelos).

Os dois rolos de gaze utilizados para amostrar o eDNA a cada duas horas foram agrupados para as análises da composição e riqueza de espécies de peixe. De forma similar, os dados dos dois visores do SVI foram agrupados para facilitar a comparação com os dados de eDNA. A variação na riqueza ao longo das 24h amostradas foi avaliada utilizando modelos aditivos generalizados (GAM). A GAM permite modelar relações não lineares entre covariáveis (tempo) e variáveis de resposta (riqueza) utilizando diferentes distribuições de probabilidade (Poisson) (PEDERSEN et al., 2019). O método de estimação de parâmetros de suavização utilizado foi o GCV para parâmetro de escala desconhecido e Mallows (GCV.Cp). O *spline* de regressão cúbica foi a base de suavização, enquanto a dimensão da base usada para representar o termo de suavização (k) foi definida como 6.

Para explorar a variação na composição dos taxa identificados pelo eDNA e pelo visor ao longo do dia, foi utilizada análises de Escalonamento Multidimensional Não Métrico (NMDS). Foi testada a diferença entre a composição de espécies amostradas entre o dia e noite utilizando um ajuste do preditor na ordenação e testando sua significância a partir de 1.000 permutações (OKSANEN et al., 2022). Uma análise de espécies indicadoras (com 9.999 permutações) foi também utilizado para identificar espécies associadas a cada um dos períodos testados (DE CÁCERES et al. 2010).

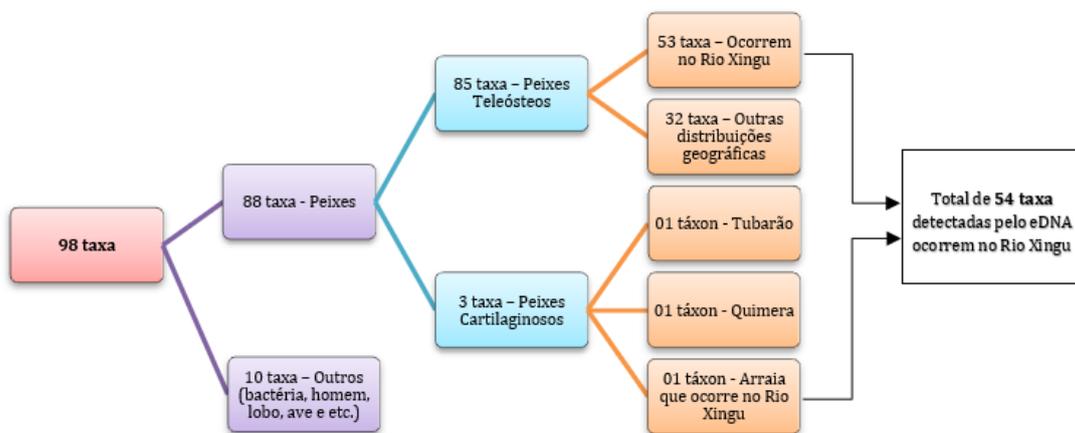
Todas as análises foram realizadas no R (R Core Team 2024). As curvas de rarefação foram realizadas no pacote iNEXT (HSIEH et al., 2020), o GAM no pacote mgcv (WOOD, 2011), nmds e envfit do pacote vegan (OKSANEN et al., 2022), e a análise de espécies indicadoras com o algoritmo IndVal.g, do pacote indicpecies (DE CÁCERES et al., 2009).

### **3 RESULTADOS**

Após as análises bioinformáticas do eDNA, obteve-se um total de 26.387 sequências de 98 taxa (Figura 6). Oitenta e oito espécies pertenciam a grupos de “peixes”,

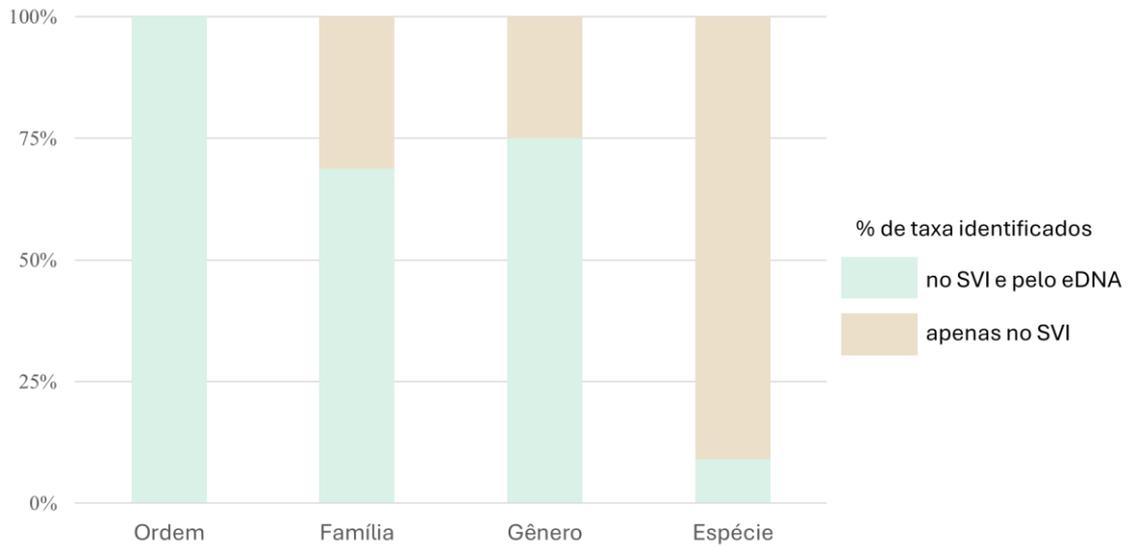
sendo 85 teleósteos e três cartilaginosos. Cinquenta e quatro taxa foram associados a peixes de ocorrência no rio Xingu, sendo estes divididos em 9 ordens (a maioria Characiformes), 20 famílias e 35 gêneros. O número de taxa de teleósteos que ocorrem no Xingu pode ser maior, tendo em vista a baixa representatividade genética dos peixes dessa bacia nas bibliotecas genômicas disponíveis (ver discussão).

Ao analisar as imagens do SVI do STP, por sua vez, foram identificados 21 taxa, divididos em 3 ordens (Characiformes, a mais abundante, e Perciformes e Siluriformes), 11 famílias e 14 gêneros.



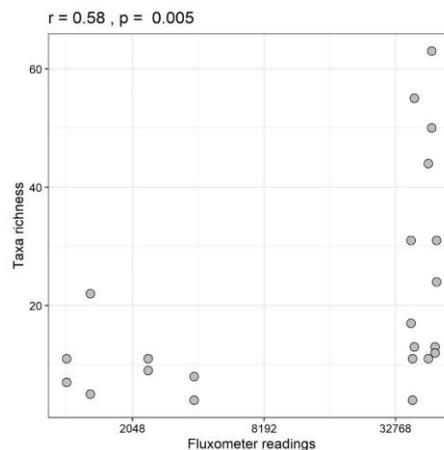
**Figura 6.** Diagrama indicando a quantidade de taxa detectados pelo eDNA, especificando os taxa de peixes e de outros organismos e destacando os taxa de peixes que ocorrem no Rio Xingu. Fonte: De autoria própria.

A eficácia do método de amostragem de eDNA para caracterizar a ictiofauna que passou pelo STP variou em função da resolução taxonômica utilizada, sendo maior quanto maior a resolução. O método foi capaz de detectar 100% das ordens que foram diagnosticadas no SVI, 72% das famílias, 75% dos gêneros e 9% das espécies (Figura 7).



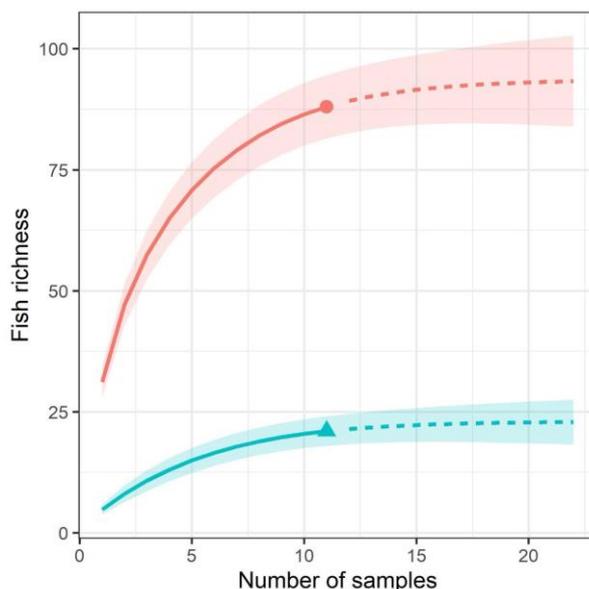
**Figura 7.** Comparação do percentual de taxa compartilhados pelas análises de eDNA e do SVI (em verde) e apenas pelo SVI do STP (na cor salmão) nos diferentes níveis taxonômicos analisados.

Um outro ponto explorado foi o esforço amostral, já que o fluxo de água que passou pelos tubos de PVC também pode ser considerado uma métrica de esforço. Nesse sentido, foi realizada uma correlação de Pearson entre o número de rotações do medidor de vazão e a riqueza de espécies. Conforme podemos observar na Figura 8, considerando o acúmulo dos pontos à direita, pode-se depreender que as gazes (filtros) não demonstraram sinal de saturação, uma vez que o número de espécies foi positiva e linearmente correlacionado ao volume de água que passou pelo equipamento.



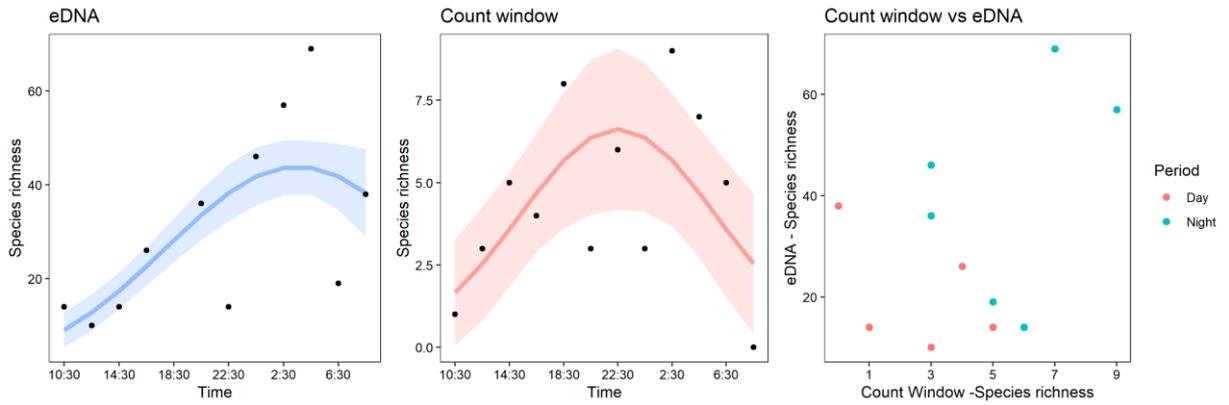
**Figura 8.** Esforço amostral - comparação do número de rotações do medidor de vazão (eixo x) e a riqueza de espécies (eixo y).

As curvas de rarefação (Figura 9) indicaram que o número de amostras de eDNA (na cor vermelha) não foi o suficiente para estimar a riqueza total, e a extrapolação indica que a riqueza deve se estabilizar por volta de 95 espécies, que seriam obtidas com cerca de 25 amostras. O número de espécies detectadas também foi sensível ao volume de água que passou por cada uma das gazes ( $r = 0,61$ ,  $p = 0,004$ ). Para o SVI, a curva de rarefação (na cor azul) chegou próxima a um platô.



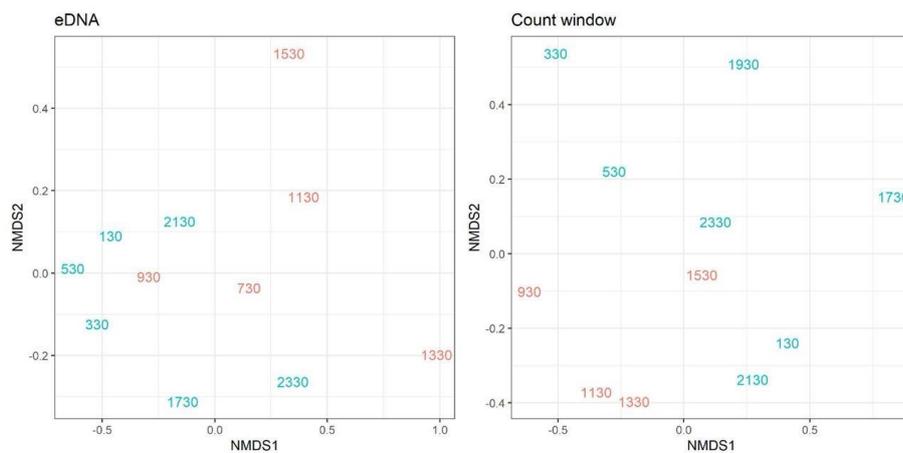
**Figura 9.** Curvas de rarefação de espécies detectadas em análises de eDNA e no SVI do STP da UHE Belo Monte, Rio Xingu, nas cores vermelho e azul, respectivamente. Linhas sólidas são valores médios enquanto os envelopes em vermelho e azul são os intervalos de confiança (95%). Os pontos indicam o total de espécies observado ao longo de 24h, enquanto a linha tracejada são extrapolações das curvas.

No que diz respeito à variação temporal, observou-se que tanto a riqueza de espécies detectada pelo eDNA como pelo SVI variaram significativamente ao longo do dia (Figura 10, eDNA:  $edf = 4,79$ ,  $Ref.df = 4,98$ ,  $p < 0,001$ ,  $Adj R^2 = 0,53$ ; SVI:  $edf = 3,27$ ,  $Ref.df = 3,90$ ,  $p = 0,049$ ,  $Adj R^2 = 0,49$  para o SVI). Entretanto, apesar de ambas as técnicas terem detectado picos de riqueza durante a noite, as estimativas de riqueza do eDNA e do visor não estiveram significativamente correlacionadas ( $t = 1,15$ ,  $df = 9$ ,  $p = 0,28$ ).



**Figura 10** Variação da riqueza de peixes detectada com análises de eDNA (painel esquerdo) e nos visores (“*Count window*” – painel central) do STP ao longo de 24h, bem como a correlação entre elas (painel direito). Linhas de tendência e intervalos de confiança foram gerados a partir de modelos aditivos generalizados (GAM).

Houve uma correlação fraca e não significativa entre as matrizes de comunidade estimadas pelos métodos de eDNA e SVI ( $r = 0,17$ ,  $P = 0,12$ ). Para ambos os métodos, houve variações significativas na composição de espécies ao longo do dia (Figura 11), particularmente entre amostras obtidas durante o dia e noite (eDNA:  $p = 0,05$ ,  $R^2 = 0,52$ ; SVI:  $p = 0,05$ ,  $R^2 = 0,55$ ). A análise de espécies indicadoras para o método eDNA sugere que duas espécies, *Anchoviella jamesi* ( $stat = 0,913$ ,  $p = 0,0145$ ) e *Aphanotorulus emarginatus* ( $stat = 0,913$ ,  $p = 0,0148$ ), estiveram significativamente associadas ao período noturno e nenhuma esteve relacionada unicamente ao período diurno. Já em relação ao SVI, não foram observadas associações significativas entre a ocorrência de espécies e os períodos do dia.



**Figura 11.** Escalonamento multidimensional não métrico (NMDS) da composição de espécies detectadas pela análise do eDNA ao longo de 24h, bem como pelo SVI (“Count window”) do STP. Os números indicam o horário de coleta das amostras.

## 4 DISCUSSÃO

O equipamento desenvolvido se mostrou promissor para os estudos de eDNA em ambientes neotropicais hiperdiversos. Durante 24h, foi coletado material genético de 88 espécies de peixes, 54 com ocorrência na bacia do Xingu, sendo que 51 foram identificadas a nível específico. Contudo, nossa hipótese não foi corroborada, e houve importantes diferenças entre a riqueza e composição de peixes avaliada pelo eDNA e aquela estimada pelo SVI ao longo do monitoramento.

Essas diferenças, bem como o número de espécies de teleósteos identificadas pelo eDNA que não pertencem à bacia do rio Xingu (32 de 85), podem ser atribuídas à baixa representatividade de espécies neotropicais nas bibliotecas genômicas, especialmente as amazônicas. Dados de junho de 2023 obtidos pela ferramenta GAPeDNA (MARQUES et al., 2020) indicam que apenas 13% das espécies amazônicas têm sequência de DNA disponível usando o gene 12S e o primer Tele02, o que faz dessa região uma das mais descobertas do mundo (MARQUES et al., 2020). Pacher et al. (2022) pontuam que o sucesso na identificação das espécies depende de base de dados genéticas completas e que estas dependem do conhecimento taxonômico dos grupos – ambos falhos para a Amazônia. De fato, a ausência de bibliotecas genômicas robustas é uma das principais limitações atuais para a substituição dos monitoramentos tradicionais pelo eDNA (SHENEKAR et al., 2020; MIYA et al., 2022). Por isso, mesmo com nossa hipótese não tendo sido corroborada, é possível atestar a capacidade do método desenvolvido em detectar espécies no ambiente, visto que o número de espécies que tiveram seu eDNA identificadas foi duas vezes maior do que o número identificado no SVI no mesmo intervalo de tempo.

Outro fator que pode explicar a baixa similaridade entre os dois métodos comparados neste estudo é a inespecificidade natural da origem do eDNA. O estudo foi desenvolvido dentro do STP, o que permitiu um relativo controle sobre a amostragem e, especialmente,

pela existência do SVI, um método paralelo, realizado no mesmo tempo e espaço, que foi utilizado para validar as espécies identificadas. Entretanto, a água que passa pelo STP é originária do reservatório principal do Complexo Hidroelétrico de Belo Monte, de onde parte do material genético de várias espécies identificadas pode ter sido carregado. De fato, o método foi capaz de identificar DNA humano, bem como de animais domésticos, como galinhas. Este resultado deve-se ao uso do reservatório como fonte de transporte e lazer da comunidade da Altamira, bem como ao uso das margens do reservatório e rio por comunidades ribeirinhas. Outro dado que reforça essa explicação foi o alto número de taxa identificados, já que, historicamente, o número de espécies que passaram em um único dia no STP, observados no SVI na época da cheia, nunca foi maior do que, aproximadamente, 40 (NORTE ENERGIA, 2023).

O método apresentado resolve dois dos principais problemas relacionados à coleta ativa de eDNA: a necessidade de intervenção humana com materiais difíceis de se obter em países em desenvolvimento e o entupimento dos filtros utilizados para reter o DNA (VERDIER et al., 2022). O método passivo aqui apresentado demanda menos ação humana e as gazes utilizadas apresentam baixo custo, assim como a estrutura necessária para mantê-los submersos. Além disso, as gazes não demonstraram sinal de saturação, uma vez que o número de espécies foi positivamente e linearmente correlacionado ao volume de água que passou pelo equipamento. Nesse sentido, são necessários outros experimentos que aumentem o intervalo de tempo de exposição das gazes para avaliar uma eventual saturação da gaze para reter o material genético à deriva.

O método apresentado foi adequado também para capturar a variação nictemeral observada na passagem de peixes pelo SVI. Embora não diretamente correlacionadas, ambos os métodos apresentaram variação semelhante da riqueza ao longo do dia. A passagem de peixes neotropicais por sistemas de transposição naturalmente apresenta variações ao longo do dia e das estações (e.g. BIZZOTO et al., 2008; FERNANDEZ et al., 2007), tendo em vista as diferenças na ecologia das espécies que utilizam o sistema. Por exemplo, para o próprio STP, espécies de Siluriformes foram identificadas principalmente à noite, enquanto espécies de Gymnontiformes exclusivamente no período noturno; durante o dia, a riqueza foi dominada por Characiformes e algumas espécies foram típicas de épocas do ano específicas (NORTE ENERGIA, 2023). Por isso, é fundamental que o desenho amostral selecionado para coleta passiva de eDNA seja

estabelecido de forma adequada, com as replicações necessárias – seja ao longo do dia e/ou ao longo dos meses e/ou anos, para ser capaz de responder à questão ecológica/taxonômica proposta (ZINGER et al., 2019). Outro ponto relevante é a utilização de vários marcadores moleculares, especialmente para ambientes com grande riqueza de espécies de peixes. Em que pese o gene 12S apresente uma detecção de espécies de teleósteos em mais de 98% quando testadas *in silico* (TABERLET et al., 2018), segundo a revisão de McElroy et al., (2020), o uso de múltiplos marcadores genéticos pode criar bases de dados de referência mais populosas e garantir estimativas robustas de riqueza de espécies para validar ainda mais a abordagem do DNA ambiental.

O método de captura passiva de eDNA aqui apresentado foi o primeiro utilizado para peixes neotropicais que temos conhecimento e acompanha a tendência de desenvolvimento e avaliação de métodos passivos para coleta de eDNA (CHEN et al., no prelo; JEUNEN et al., 2022). Vale citar que, até 2019, não havia na literatura descrição de métodos passivos para monitoramento de eDNA (TSUJI et al., 2019). Desde então, especialmente em função das dificuldades de utilização dos métodos ativos de filtragem, foram desenvolvidos experimentos para avaliar a possibilidade de uso de métodos passivos. Em um dos primeiros, Kirtane et al. (2020) testou dois tipos de materiais absorventes para amostragem passiva de eDNA em laboratório, mesocosmo e em campo, sugerindo que a coleta ao longo do tempo de forma passiva é melhor que uma amostragem ativa coletada em um único instante. Esse estudo pioneiro abriu caminho para diversos outros experimentos comparando as amostragens ativa e passiva. Por exemplo, Bessey et al. (2021) demonstraram que os métodos ativos (filtragem) e passivo (submersão de membranas específicas) são semelhantes para amostragem de ictiofaunas de recifes temperados; Jeunen et al. (2022), demonstram que o método de filtragem ativo e passivo também são semelhantes, tanto em um mesocosmo controlado, quanto em ambiente natural. Contudo, diferentes materiais filtrantes obtiveram diferentes eficiência, com os materiais mais porosos tendo resultados melhores do que membranas (JEUNEN et al., 2022); Zang et al. (2024) demonstrou que a amostragem passiva apresentou melhor resolução espacial que a amostragem ativa; e finalmente, Chen et al. (no prelo) obtiveram resultados ainda mais animadores, pois a comparação entre a filtragem ativa e o método passivo com fibras de vidro (*glass-fiber*) demonstraram que ambos os métodos tiveram resultados semelhantes para a riqueza e variação espacial de peixes, mas o método de coleta passivo, por absorver o eDNA por um tempo maior, foi mais adequado para

identificar a presença de espécies raras e com baixa abundância. Assim, a partir de toda a literatura já existente e com os resultados obtidos neste trabalho, é possível supor que não seja necessária uma comparação direta entre os métodos ativos e passivos de amostragem de eDNA em ambiente neotropical.

Todos esses resultados foram obtidos a um custo muito baixo se comparado, por exemplo, com a própria análise pelo SVI, que demandou, inicialmente, todo um investimento em infraestrutura para o posicionamento das grades para direcionamento dos peixes e dos visores, além das câmeras e equipamentos para captura e armazenamento das imagens. Uma vez implantado, é necessário um grande esforço humano para manter o sistema em funcionamento e, especialmente, para identificação das espécies que foram registradas nos vídeos. O equipamento apresentado neste estudo permitiria que a amostragem fosse realizada por mais tempo e com mais réplicas, com a mesma quantidade de recursos, o que é fundamental em um contexto que recursos limitados direcionam as metodologias que devem ser utilizadas para maximizar os resultados obtidos (CAUGHLAN; OAKLEY, 2001).

Por outro lado, o SVI permite a avaliação da abundância das espécies, estimativa que ainda não está disponível com acurácia para o eDNA (THOMSEN et al., 2012). Além dessa limitação, outras duas limitações merecem ser observadas: o SVI permite que se defina a direção do movimento do peixe (jusante-montante ou montante-jusante), bem como restringe sua amostragem ao STP, o que não acontece com o eDNA, que, como discutido acima, possivelmente coletou material genético carreado do reservatório. Ao mesmo tempo, o avanço e aperfeiçoamento das técnicas de PCR quantitativa devem superar essa restrição bem breve. Além disso, para ambientes com grande diversidade (> 100 espécies), como é o caso do rio Xingu, embora haja evidências que os métodos tracionais e de eDNA tenham riqueza semelhante, ainda é necessário complementação das bibliotecas genômicas, aumento no esforço de amostragem e utilização de estudos com vários marcadores, para que sua abordagem seja totalmente validada (MCELROY et al., 2020).

Nesse sentido, é interessante pontuar que é possível que o método de eDNA, em um primeiro momento, não substitua os monitoramentos tradicionais em ambiente aquático, mas que ambos sejam usados de forma complementar. Por exemplo, Stat et al. (2018) demonstraram que a utilização conjunta de eDNA e vídeos com iscas (BRUV, sigla em

inglês para *Baited Remote Underwater Video*) aumentou em mais de 30% a riqueza estimada, mesmo que, individualmente, o BRUV tenha apresentado melhor performance. Isso se deve ao fato de que algumas espécies foram identificadas apenas pelo eDNA, resultado semelhante ao obtido nesse estudo.

As espécies de ambiente aquático, especialmente aquelas de água doce, estão entre as mais ameaçadas do mundo em função das ações humanas (Dudgeon, 2019). Os métodos de eDNA têm se mostrado robustos para auxiliar no entendimento da riqueza existente, informação que é essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação. Entretanto, para que se possa tornar efetivamente uma ferramenta em prol da conservação, a complementação das bibliotecas genômicas é necessária, bem como a realização de outros estudos para suportar a utilização de gaze como meio absorvente. O próprio esforço e delineamento amostral deve ser intensificado visto a complexidade e diversidade de rios tropicais. Essas restrições não se aplicam ao método proposto em si, mas questões mais amplas envolvendo a tecnologia do eDNA. Por isso, o método aqui apresentado e validado tem grande potencial para se tornar uma importante ferramenta para auxiliar na missão de conservação da ictiofauna em regiões remotas e altamente diversas.

## 5 REFERÊNCIAS

ÁGUAS AMAZÔNICAS, 2022. Disponível em: <http://pt.aguasamazonicas.org/bacias/principais-sub-bacias/xingu/>. Acesso em: 07 abr 2024.

ANTOGNAZZA, C. M. et al. Environmental DNA as a non-invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads ( *Alosa* spp.). **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 29, n. 1, p. 148–152, 25 jan. 2019.

ARRINGTON, D. A.; WINEMILLER, K. O. Diel changeover in sandbank fish assemblages in a neotropical floodplain river. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 442–459, ago. 2003.

BARNES, M. A.; TURNER, C. R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. **Conservation Genetics**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2016.

BENG, K. C.; CORLETT, R. T. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. **Biodiversity and Conservation**, v. 29, n. 7, p. 2089–2121, 9 jun. 2020.

BESSEY, Cindy et al. Comparison of materials for rapid passive collection of environmental DNA. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 7, p. 2559-2572, 2022.

BIZZOTTO, P. M. et al. Influence of seasonal, diel, lunar, and other environmental factors on upstream fish passage in the Igarapava Fish Ladder, Brazil. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 3, p. 461-472, 2009.

BOHMANN, K. et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, n. 6, p. 358–367, jun. 2014.

BOYER, F. et al. obitools: A unix-inspired software package for DNA metabarcoding. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 1, p. 176–182, 2016.

BRONNER, I. F.; QUAIL, M. A. Best Practices for Illumina Library Preparation. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 102, n. 1, p. 1–48, 2019.

BYLEMANS, J. et al. A performance evaluation of targeted eDNA and eDNA metabarcoding analyses for freshwater fishes. **Environmental DNA**, v. 1, n. 4, p. 402–414, 2019.

CHAO, A. et al. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. **Ecological Monographs**, v. 84, n. 1, p. 45–67, 2014.

CHEN, Xiaoyu et al. Comparative evaluation of common materials as passive samplers of environmental DNA. **Environmental Science & Technology**, v. 56, n. 15, p. 10798-

10807, 2022.

CHEN, Xiaoyu et al. Passive Edna Samplers Facilitate Biodiversity Monitoring and Rare Species Detection. **Available at SSRN 4643730**. No prelo.

CINDY, B. et al. Passive eDNA collection enhances aquatic biodiversity analysis. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, 2021.

COSTA, I. D. DA; NOGUEIRA, W. V. Diel variation in the structure of fish assemblages in south western Amazon streams. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 28, n. 0, 2016.

DAVIS, N. M. et al. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2018.

DE CÁCERES, M. et al. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. **Ecology**, n. 90, p. 3566–3574, 2009.

DE CÁCERES, M. et al. Improving indicator species analysis by combining groups of sites. **Oikos**, n. 119, p. 1674–1684, 2010.

DEINER, K. et al. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. **Biological Conservation**, v. 183, p. 53–63, mar. 2015.

DUDGEON, D. Multiple threats imperil freshwater biodiversity in the Anthropocene. **Current Biology**, v. 29, p. 960–967, 2019.

EDGAR, R. C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, v. 27, n. 16, p. 2194–2200, 2011.

FERNANDEZ, Domingo Rodriguez et al. Diel variation in the ascent of fishes up an experimental fish ladder at Itaipu Reservoir: fish size, reproductive stage and taxonomic group influences. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 215-222, 2007.

FICETOLA, G. F. et al. Species detection using environmental DNA from water samples. **Biology Letters**, v. 4, n. 4, p. 423–425, 23 ago. 2008.

FITZGERALD, D. B. et al. Diversity and community structure of rapids-dwelling fishes of the Xingu River: Implications for conservation amid large-scale hydroelectric development. **Biological Conservation**, v. 222, n. March, p. 104–112, jun. 2018.

GIULIA, M. et al. Net gain: Low-cost, trawl-associated eDNA samplers upscale ecological assessment of marine demersal communities. **Environmental DNA**, n. December 2022, p. 1–13, 2023.

GOLDBERG, C. S. et al. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). **Freshwater Science**, v. 32, n. 3, p. 792–800, set. 2013.

GOLDBERG, C. S. et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. **Methods in Ecology and Evolution**, 2016.

HSIEH, C. et al. iNEXT: Interpolation and extrapolation for species diversity. R package version 2.0.20, 2020.

JERDE, C. L. et al. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. **Conservation Letters**, v. 4, n. 2, p. 150–157, abr. 2011.

JEUNEN, Gert-Jan et al. Moving environmental DNA (eDNA) technologies from benchtop to the field using passive sampling and PDQeX extraction. **Environmental DNA**, v. 4, n. 6, p. 1420-1433, 2022.

JUNK, W. J. et al. A classification of major naturally-occurring amazonian lowland wetlands. **Wetlands**, v. 31, n. 4, p. 623–640, 2011.

KIRTANE, Anish; ATKINSON, John D.; SASSOUBRE, Lauren. Design and validation of passive environmental DNA samplers using granular activated carbon and montmorillonite clay. **Environmental Science & Technology**, v. 54, n. 19, p. 11961-

11970, 2020.

KLYMUS, K. E. et al. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. **Biological Conservation**, v. 183, p. 77–84, mar. 2015.

LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; ROSABAL, M.; BERNATCHEZ, L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 6, p. 1401–1414, nov. 2016.

LATRUBESSE, E. M.; STEVAUX, J. C.; SINHA, R. Tropical rivers. **Geomorphology**, v. 70, n. 3- 4 SPEC. ISS., p. 187–206, 2005.

LEEMPOEL, K.; HEBERT, T.; HADLY, E. A. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 287, n. 1918, p. 20192353, 15 jan. 2020.

LINDENMAYER, D. B.; LIKENS, G. E. The science and application of ecological monitoring. **Biological Conservation**, v. 143, n. 6, p. 1317–1328, jun. 2010.

MAHÉ, F. et al. Swarmv2: Highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. **PeerJ**, v. 2015, n. 12, p. 1–12, 2015.

MAJANEVA, M. et al. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. **Scientific Reports**, n. 7485, p. 1–11, 2018.

MARQUES, V. et al. GAPeDNA: Assessing and mapping global species gaps in genetic databases for eDNA metabarcoding. **Diversity and Distributions**, v. 27, n. 10, p. 1880–1892, 2021.

MCELROY, Mary E. et al. Calibrating environmental DNA metabarcoding to conventional surveys for measuring fish species richness. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 8, p. 276, 2020.

MORAN, A. J.; PROSSER, S. W. J.; MORAN, J. A. DNA metabarcoding allows non-invasive identification of arthropod prey provisioned to nestling Rufous hummingbirds (*Selasphorus rufus*). **PeerJ**, v. 7, n. 3, p. e6596, 5 mar. 2019.

MURAKAMI, H. et al. Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. **Fisheries Science**, n. 2019, p. 327–337, 2022.

MIYA, Masaki. Environmental DNA metabarcoding: A novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. **Annual Review of Marine Science**, v. 14, p. 161-185, 2022.

NORTE ENERGIA. **23º Relatório Consolidado do Projeto de Monitoramento da Ictiofauna da UHE Belo Monte**, 2023.

OKSANEN, J. et al. **vegan: Community Ecology Package**. R package version 2.6-2. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>, 2022.

PASCHER, Kathrin; ŠVARA, Vid; JUNGMEIER, Michael. Environmental DNA-based methods in biodiversity monitoring of protected areas: Application range, limitations, and needs. **Diversity**, v. 14, n. 6, p. 463, 2022.

PEDERSEN, E. J. et al. Hierarchical generalized additive models in ecology: an introduction with mgcv. **PeerJ**, v. 7, n. 5, p. e6876, 27 maio 2019.

SELLERS, G. S. et al. Mu-DNA: A modular universal DNA extraction method adaptable for a wide range of sample types. **Metabarcoding and Metagenomics**, v. 2, p. 1–11, 2018.

SCHENEKAR, Tamara et al. Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. **River Research and Applications**, v. 36, n. 7, p. 1004-1013, 2020.

TABERLET, P. et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA

metabarcoding. **Molecular Ecology**, v. 21, p. 2045–2050, 2012.

TABERLET, P. et al. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. **Oxford University Press**, mar. 2018.

THOMSEN, P. F. et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 11, p. 2565–2573, jun. 2012.

TSUJI, Satsuki et al. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. **Environmental DNA**, v. 1, n. 2, p. 99-108, 2019.

VERDIER, Héloïse et al. Passive sampling of environmental DNA in aquatic environments using 3D-printed hydroxyapatite samplers. **Molecular Ecology Resources**, v. 22, n. 6, p. 2158-2170, 2022.

WALLACE, E. et al. Trends in climate extreme indices assessed in the Xingu river basin - Brazilian Amazon. **Weather and Climate Extremes**, v. 31, n. January, p. 100306, 2021.

WINEMILLER, K. Effects of seasonality and fish movement on tropical river food webs. **Journal of Fish Biology**, v. 53, n. SUPPL. A, p. 267–296, dez. 1998.

WOOD, S. N. Fast stable restricted maximum likelihood and marginal likelihood estimation of semiparametric generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 73, p. 3–36, 2011.

ZHANG, Li et al. Use of passive sampling in environmental DNA metabarcoding technology: Monitoring of fish diversity in the Jiangmen coastal waters. **Science of The Total Environment**, v. 908, p. 168298, 2024.

ZINGER, Lucie et al. DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. **Molecular ecology**, v. 28, n. 8, p. 1857-1862, 2019.